

IAP20 Rec'd PCT/PTO 01 FEB 2006

# Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in transgenen Organismen

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft können diese Nukleinsäuresequenzen gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren, in dem Organismus exprimiert werden. Besonders vorteilhaft sind Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase-, eine  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elongasen aus *Thalassiosira*, *Euglena* oder *Ostreococcus*. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten  $\omega$ -3 Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, besonders von  $\omega$ -3 Fettsäuren mit mehr als drei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\omega$ -3-Doppelbindungen aufgrund der Expression der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Elongasen und Desaturasen vorteilhaft in Verbindung mit  $\omega$ -3-Desaturasen z.B. einer  $\omega$ -3-Desaturase aus Pilzen der Familie Pythiaceae wie der Gattung Phytophthora beispielsweise der Gattung und Art Phytophthora infestans oder einer  $\omega$ -3-Desaturase aus Algen wie der Familie der Prasinophyceae z.B. der Gattung Ostreococcus speziell der Gattung und Art Ostreococcus tauri oder Diatomeen wie der Gattung Thalassiosira speziell der Gattung und Art Thalassiosira pseudonana.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren.

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

Fettsäuren und Triacylglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich.

Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren oder um Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet. Mehrfach-  
5 ungesättigte Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure sind für Säugetiere essentiell, da sie nicht von diesen selbst hergestellt werden können. Deshalb stellen mehrfach ungesättigte  $\omega$ -3-Fettsäuren und  $\omega$ -6-Fettsäuren einen wichtigen Bestandteil der tierischen und menschlichen Nahrung dar.

Mehrfach ungesättigte langkettige  $\omega$ -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ) oder Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ ) sind wichtige  
10 Komponenten der menschlichen Ernährung aufgrund ihrer verschiedenen Rollen in der Gesundheit, die Aspekte wie die Entwicklung des kindlichen Gehirns, der Funktionalität des Auges, der Synthese von Hormonen und anderer Signalstoffe, sowie die Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Beschwerden, Krebs und Diabetes umfassen (Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LA und Yeo YK Pharmacol Res 40:211-225, 1999). Es  
15 besteht aus diesem Grund ein Bedarf an der Produktion mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren.

Aufgrund der heute üblichen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist ein Zusatz von mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, die bevorzugt in Fischölen  
20 vorkommen, zur Nahrung besonders wichtig. So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ ) oder Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ) Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Der ungesättigten Fettsäure DHA wird dabei ein positiver Effekt auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gehirnfunktionen zugeschrieben.

Im folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFAs, LCPUFA  
25 oder LCPUFAs bezeichnet (poly unsaturated fatty acids, **PUFA**, mehrfach ungesättigte Fettsäuren; long chain poly unsaturated fatty acids, **LCPUFA**, langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikro-  
30 organismen wie Mortierella oder Schizochytrium oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Algen wie Crypthecodinium oder Phaeodactylum und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = Triglycerole) anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie z.B. Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt. Sehr  
35 langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA, Arachidonsäure (= ARA, C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ ), Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (C20:3 $\Delta^{8,11,14}$ ) oder Docosapentaensäure (DPA, C22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$ ) werden in Ölfruchtpflanzen wie Raps, Soja, Sonnenblume, Färbersaflor nicht synthetisiert. Übliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische wie Hering, Lachs, Sardine, Goldbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Thunfisch oder Algen.

40 Je nach Anwendungszweck werden Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. So werden z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fett-

säuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit der Prävention einer Herzerkrankung zugeschrieben. Durch Zugabe dieser  $\omega$ -3-Fettsäuren zur Nahrung kann das Risiko einer Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert werden. Auch entzündliche speziell chronisch entzündliche Prozesse im Rahmen immunologischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis lassen sich durch  $\omega$ -3-Fettsäuren positiv beeinflussen. Sie werden deshalb Lebensmitteln speziell diätischen Lebensmitteln zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung.  $\omega$ -6-Fettsäuren wie Arachidonsäure haben bei diesen rheumatischen Erkrankungen aufgrund unserer üblichen Nahrungsmittelzusammensetzung eher einen negativen Effekt auf diese Krankheiten.

$\omega$ -3- und  $\omega$ -6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, den sogenannten Eicosanoiden wie den Prostaglandinen, die sich von der Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten, den Thromoxanen und Leukotrienen, die sich von der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten. Eicosanoide (sog. PG<sub>2</sub>-Serie), die aus  $\omega$ -6-Fettsäuren gebildet werden fördern in der Regel Entzündungsreaktionen, während Eicosanoide (sog. PG<sub>3</sub>-Serie) aus  $\omega$ -3-Fettsäuren geringe oder keine entzündungsfördernde Wirkung haben.

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine  $\Delta$ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine  $\Delta$ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine  $\Delta$ -12-Desaturase beansprucht. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und zu charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organismus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird.  $\Delta$ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO00/21557 und WO 99/27111 beschrieben und auch die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen beschrieben wie in WO98/46763 WO98/46764, WO9846765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desaturasen wie in WO99/64616 oder WO98/46776 und Bildung polyungesättigter Fettsäuren beschrieben und beansprucht. Bzgl. der Effektivität der Expression von Desaturasen und ihren Einfluss auf die Bildung polyungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, dass durch Expression einer einzelnen Desaturase wie bisher beschrieben lediglich geringe



Gehalte an ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z.B.  $\gamma$ -Linolensäure und Stearidonsäure erreicht wurden. Weiterhin wurde in der Regel ein Gemisch aus  $\omega$ -3- und  $\omega$ -6-Fettsäuren erhalten.

5 Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen wie Mikroalgen wie *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphiridium*-Arten, *Thraustochytrien*-Arten, *Schizochytrien*-Arten oder *Cryptocodinium*-Arten, Ciliaten, wie *Stylonychia* oder *Colpidium*, Pilze, wie *Mortierella*, *Entomophthora* oder *Mucor* und/oder Moosen wie *Physcomitrella*, *Ceratodon* und *Marchantia* (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) *Botanica Marina* 41: 553-558; K. Totani & K. Oba (1987) *Lipids* 22: 1060-1062; M. Akimoto et al. (1998) *Appl. Biochemistry and Biotechnology* 73: 269-278).  
10 Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Mutation und Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls wie den mehrfach ungesättigten  
15 Fettsäuren ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Deshalb werden, wann immer möglich wie oben beschrieben gentechnologische Verfahren bevorzugt. Mit Hilfe der vorgenannten Mikroorganismen lassen sich jedoch nur begrenzte Mengen der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DPA, EPA oder ARA herstellen. Wobei diese in der Regel je nach verwendeten Mikroorganismus als Fettsäuregemische aus beispielsweise EPA, DPA und ARA anfallen.  
20

Für die Synthese von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) werden verschiedene Synthesewege diskutiert (Figur. 1). So erfolgt die Produktion von EPA bzw. DHA in marinen Bakterien wie *Vibrio* sp. oder *Shewanella* sp. nach dem Polyketid-Weg (Yu, R. et al. *Lipids* 35:1061-1064, 2000; Takeyama, H. et al. *Microbiology* 143:2725-2731, 1997).  
25

Ein alternative Strategie verläuft über die wechselnde Aktivität von Desaturasen und Elongasen (Zank, T.K. et al. *Plant Journal* 31:255-268, 2002; Sakuradani, E. et al. *Gene* 238:445-453, 1999). Eine Modifikation des beschriebenen Weges über  $\Delta$ 6-Desaturase,  $\Delta$ 6-Elongase,  $\Delta$ 5-Desaturase,  $\Delta$ 5-Elongase,  $\Delta$ 4-Desaturase ist der Sprecher-Syntheseweg (Sprecher 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1486:219-231) in Säugetieren. Anstelle der  $\Delta$ 4-Desaturierung erfolgt hier ein weiterer Elongationsschritt auf  $C_{24}$ , eine weitere  $\Delta$ 6-Desaturierung und abschliessend eine  $\beta$ -Oxidation auf die  $C_{22}$ -Kettenlänge. Für die Herstellung in Pflanzen und Mikroorganismen ist der sogenannte Sprecher-Syntheseweg (siehe Figur 1) allerdings nicht geeignet, da die Regulationsmechanismen nicht bekannt sind.  
30  
35

Die polyungesättigten Fettsäuren können entsprechend ihrem Desaturierungsmuster in zwei große Klassen, in  $\omega$ -6- oder  $\omega$ -3-Fettsäuren eingeteilt werden, die metabolisch und funktionell unterschiedlich Aktivitäten haben (Fig. 1).

Als Ausgangsprodukt für den  $\omega$ -6-Stoffwechselweg fungiert die Fettsäure Linolsäure ( $18:2^{\Delta 9,12}$ ), während der  $\omega$ -3-Weg über Linolensäure ( $18:3^{\Delta 9,12,15}$ ) abläuft. Linolensäure  
40



wird dabei durch Aktivität einer  $\omega$ -3-Desaturase gebildet (Tocher et al. 1998, Prog. Lipid Res. 37, 73-117 ; Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113).

Säugetiere und damit auch der Mensch verfügen über keine entsprechende Desaturaseaktivität ( $\Delta$ -12- und  $\omega$ -3-Desaturase) und müssen diese Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Über die Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen werden dann aus diesen Vorstufen die physiologisch wichtigen polyungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA, 20:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), eine  $\omega$ -6-Fettsäure und die beiden  $\omega$ -3-Fettsäuren Eicosapentaen- (= EPA, 20:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,17,19</sup>) synthetisiert. Die Applikation von  $\omega$ -3-Fettsäuren zeigt dabei die wie oben beschrieben therapeutische Wirkung bei der Behandlung von Herz-Kreislaufkrankheiten (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100-108), Entzündungen (Calder 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345-358) und Arthritis (Cleland und James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305-2307).

Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist es deshalb wichtig bei der Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren eine Verschiebung zwischen dem  $\omega$ -6-Syntheseweg und dem  $\omega$ -3-Syntheseweg (siehe Figur 1) zu erreichen, so dass mehr  $\omega$ -3-Fettsäuren hergestellt werden. In der Literatur wurden die enzymatischen Aktivitäten verschiedener  $\omega$ -3-Desaturasen beschrieben, die C<sub>18:2</sub>-, C<sub>22:4</sub>- oder C<sub>22:5</sub>-Fettsäuren desaturieren (siehe Figur 1). Keine der biochemisch beschriebenen Desaturasen setzt jedoch ein breites Substratspektrum des  $\omega$ -6-Synthesewegs zu den entsprechenden Fettsäuren des  $\omega$ -3-Syntheseweg um.

Es besteht daher weiterhin ein großer Bedarf an einer  $\omega$ -3-Desaturase, die zur Herstellung von  $\omega$ -3-polyungesättigte Fettsäuren geeignet ist. Alle bekannten pflanzlichen und cyanobakteriellen  $\omega$ -3-Desaturasen desaturieren C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit Linolsäure als Substrat, können aber keine C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren desaturieren.

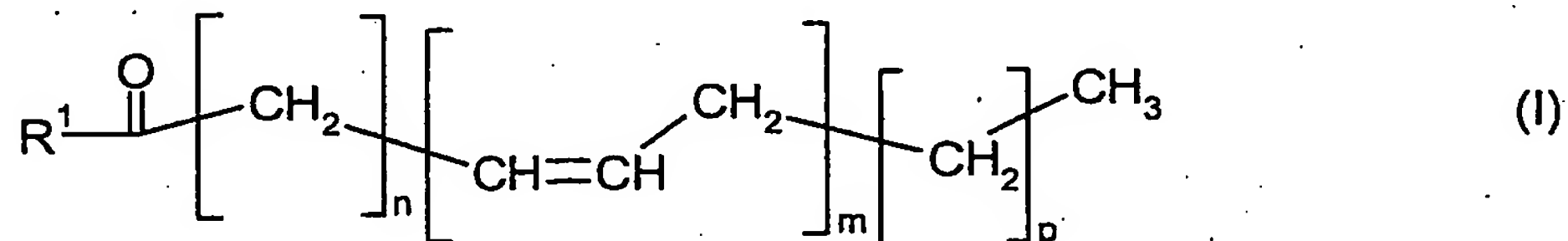
Von dem Pilz *Saprolegnia dicilina* ist eine  $\omega$ -3-Desaturase bekannt [Pereira et al. 2004, Biochem. J. 378(Pt 2):665-71], die C<sub>20</sub>-mehrfach ungesättigte Fettsäuren desaturieren kann. Von Nachteil ist jedoch, dass diese  $\omega$ -3-Desaturase keine C<sub>18</sub>- oder C<sub>22</sub>-PUFAs, wie den wichtigen Fettsäuren C<sub>18:2</sub>-, C<sub>22:4</sub>- oder C<sub>22:5</sub>-Fettsäuren des  $\omega$ -6-Syntheseweg desaturieren kann. Ein weiterer Nachteil dieses Enzyms ist, dass es keine Fettsäuren desaturieren kann, die an Phospholipide gebunden sind. Es werden nur die CoA-Fettsäureester umgesetzt.

Die Verlängerung von Fettsäuren durch Elongasen um 2 bzw. 4 C-Atome ist für die Produktion von C<sub>20</sub>- bzw. C<sub>22</sub>-PUFAs von entscheidender Bedeutung. Dieser Prozess verläuft über 4 Stufen. Der erste Schritt stellt die Kondensation von Malonyl-CoA an das Fettsäure-Acyl-CoA durch die Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS, im weiteren Text als Elongase bezeichnet). Es folgt dann ein Reduktionsschritt (Ketoacyl-CoA-Reduktase, KCR), ein Dehydratationsschritt (Dehydratase) und ein abschliessender Reduktionsschritt (enoyl-CoA-Reduktase). Es wurde postuliert, dass die Aktivität der Elongase die Spezifität und Geschwindigkeit des gesamten Prozesses beeinflussen (Millar and Kunst, 1997 Plant Journal 12:121-131).

- In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, Elongase Gene zu erhalten. Millar and Kunst, 1997 (Plant Journal 12:121-131) und Millar et al. 1999, (Plant Cell 11:825-838) beschreiben die Charakterisierung von pflanzlichen Elongasen zur Synthese von einfachungesättigten langkettigen Fettsäuren (C22:1) bzw. zur
- 5 Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren für die Wachsbildung in Pflanzen (C<sub>28</sub>-C<sub>32</sub>). Beschreibungen zur Synthese von Arachidonsäure und EPA finden sich beispielsweise in WO0159128, WO0012720, WO02077213 und WO0208401. Die Synthese von mehrfachungesättigter C24 Fettsäuren ist beispielsweise in Tvrdik et al 2000, JCB 149:707-717 oder WO0244320 beschrieben.
- 10 Zur Herstellung von DHA (C22:6 n-3) in Organismen, die diese Fettsäure natürlicherweise nicht produzieren, wurde bisher keine spezifische Elongase beschrieben. Bisher wurden nur Elongasen beschrieben, die C<sub>20</sub>- bzw. C<sub>24</sub>-Fettsäuren bereitstellen. Eine  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität wurde bisher noch nicht beschrieben.
- 15 Höhere Pflanzen enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3). ARA, EPA und DHA kommen im Samenöl höherer Pflanzen gar nicht oder nur in Spuren vor (E. Ucciani: Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Technique & Documentation – Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Es wäre jedoch vorteilhaft, in höheren Pflanzen, bevorzugt in Ölsaaten wie Raps, Lein, Sonnenblume und Soja, LCPUFAs herzustellen, da auf diese Weise große Mengen qualitativ
- 20 hochwertiger LCPUFAs für die Lebensmittelindustrie, die Tierernährung und für pharmazeutische Zwecke kostengünstig gewonnen werden können. Hierzu müssen vorteilhaft über gentechnische Methoden Gene kodierend für Enzyme der Biosynthese von LCPUFAs in Ölsaaten eingeführt und exprimiert werden. Dies sind Gene, die beispielsweise für  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen oder  $\Delta$ -4-
- 25 Desaturasen codieren. Diese Gene können vorteilhaft aus Mikroorganismen und niederen Pflanzen isoliert werden, die LCPUFAs herstellen und in den Membranen oder Triacylglyceriden einbauen. So konnten bereits  $\Delta$ -6-Desaturase-Gene aus dem Moos *Physcomitrella patens* und  $\Delta$ -6-Elongase-Gene aus *P. patens* und dem Nematoden *C. elegans* isoliert.
- 30 Erste transgene Pflanzen, die Gene kodierend für Enzyme der LCPUFA-Biosynthese enthalten und exprimieren und LCPUFAs produzieren wurden beispielsweise in DE 102 19 203 (Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen) erstmals beschrieben. Diese Pflanzen produzieren allerdings LCPUFAs in Mengen, die für eine Aufarbeitung der in den Pflanzen enthaltenen Öle noch weiter
- 35 optimiert werden müssen.
- Um eine Anreicherung der Nahrung und/oder des Futters mit diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren speziell in eukaryontischen Systemen.
- 40 Es bestand daher die Aufgabe weitere Gene bzw. Enzyme, die für die Synthese von LCPUFAs geeignet sind, speziell Gene, die eine  $\Delta$ -5-Elongase-, eine  $\Delta$ -5-Desaturase-,

$\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- oder  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität aufweisen, für die Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Eine weitere Aufgabe dieser Erfindung war die Bereitstellung von Genen bzw. Enzymen, die eine Verschiebung von den  $\omega$ -6-Fettsäuren zu den  $\omega$ -3-Fettsäuren hin ermöglichen.

- 5 Weiterhin bestand die Aufgabe ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus vorteilhaft in einem eukaryontischen Organismus bevorzugt in einer Pflanze oder einem Mikroorganismus zu entwickeln. Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



10

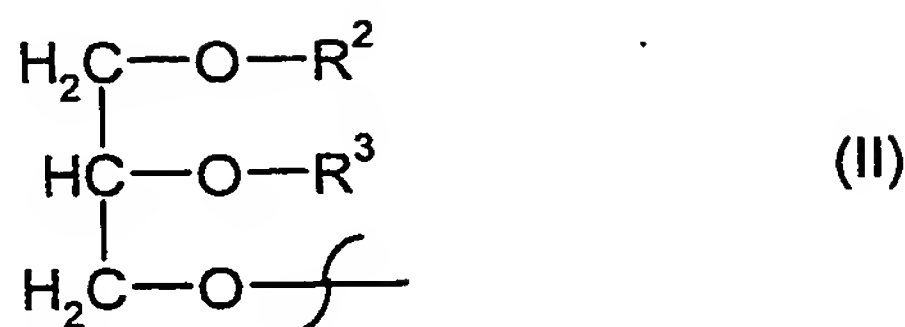
in transgenen Organismen mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.-% dieser Verbindungen bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- 15 a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -9-Elongase- und/oder eine  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität codiert, und
- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -8-Desaturase- und/oder eine  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität codiert, und
- c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität codiert, und
- 20 d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität codiert, und
- e) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität codiert, und

wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

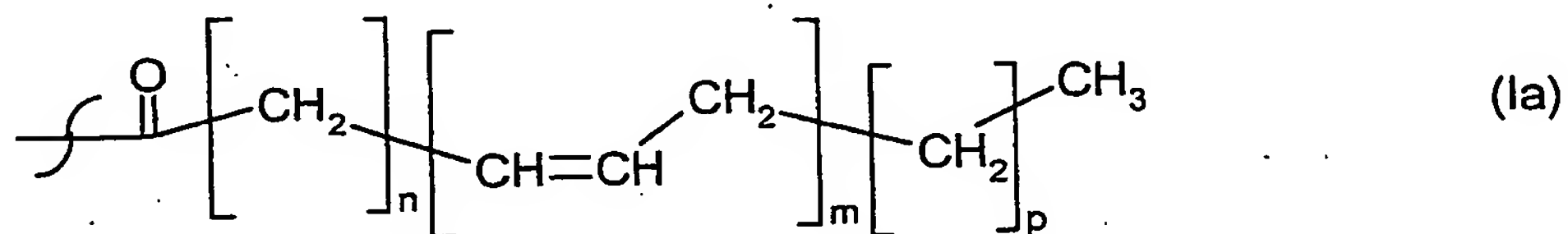
- 25  $\text{R}^1 =$  Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II





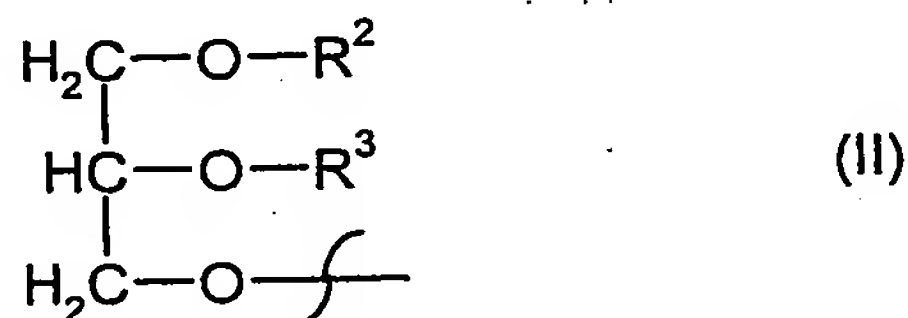
5  $\text{R}^2 =$  Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes  $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-,

$\text{R}^3 =$  Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes  $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-, oder  $\text{R}^2$  oder  $\text{R}^3$  unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:



10  $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $9$ ,  $m = 2, 3, 4, 5$  oder  $6$  und  $p = 0$  oder  $3$ , gelöst.

$\text{R}^1$  bedeutet in der allgemeinen Formel I Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



15

Die oben genannten Reste von  $\text{R}^1$  sind immer in Form ihrer Thioester an die Verbindungen der allgemeinen Formel I gebunden.

20  $\text{R}^2$  bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes  $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-,

25 Als Alkylreste seien substituiert oder unsubstituiert, gesättigt oder ungesättigte  $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentylcarbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-, n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Hepta-

- decylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- or n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Gesättigte oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-,  
 5 n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>11</sub>-Alkylcarbonyl-,  
 10 C<sub>12</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>13</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>14</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen  
 15 enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fettsäuren ab.
- 20 R<sup>3</sup> bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl.

- Als Alkylreste seien substituiert oder unsubstituiert, gesättigt oder ungesättigte C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentylcarbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-,  
 25 n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- or n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Gesättigte oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-,  
 30 n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>11</sub>-Alkylcarbonyl-,  
 35 C<sub>12</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>13</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>14</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen  
 40 enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft drei,

vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fettsäuren ab.

Die oben genannten Reste von  $R^1$ ,  $R^2$  and  $R^3$  können mit Hydroxyl- und/oder Epoxygruppen substituierte sein und/oder können Dreifachbindungen enthalten.

- 5 Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens zwei vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Besonders vorteilhaft enthalten die Fettsäuren vier fünf oder sechs Doppelbindungen. Im Verfahren hergestellte Fettsäuren haben vorteilhaft 18-, 20- oder 22-C-Atome in der Fettsäurekette, bevorzugt enthalten die Fettsäuren 20 oder 22 Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette. Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im
- 10 Verfahren verwendeten Nukleinsäuren wenig oder gar nicht umgesetzt. Unter wenig ist zu verstehen, das im Vergleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 % der Aktivität, vorteilhaft weniger als 3 %, besonders vorteilhaft mit weniger als 2 %, ganz besonders bevorzugt mit weniger als 1; 0,5; 0,25
- 15 oder 0,125 % umgesetzt werden. Diese hergestellten Fettsäuren können als einziges Produkt im Verfahren hergestellt werden oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

- Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,
- 20  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren, verwendet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 25 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45,
- 30 SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO:
- 35 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8,
- 40 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18,



5 SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28,  
 SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38,  
 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48,  
 SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62,  
 10 SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72,  
 SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82,  
 SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94,  
 SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO:  
 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ  
 ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138 oder  
 SEQ ID NO: 184 dargestellten Aminosäuresequenzen ableiten lassen, oder

c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7,  
 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17,  
 15 SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27,  
 SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37,  
 SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47,  
 SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61,  
 SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71,  
 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81,  
 20 SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93,  
 SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO:  
 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ  
 ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID  
 NO: 183 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens  
 25 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID  
 NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID  
 NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID  
 NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID  
 NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID  
 30 NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID  
 NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID  
 NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID  
 NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID  
 NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ  
 35 ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO:  
 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ  
 ID NO: 138 oder SEQ ID NO: 184 codieren und eine  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-  
 Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-  
 oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität aufweisen.

40 Vorteilhaft bedeuten die Substituenten  $R^2$  oder  $R^3$  in den allgemeinen Formeln I und II  
 unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes  $C_{18}$ - $C_{22}$ -Alkylcarbonyl-,  
 besonders vorteilhaft bedeuten sie unabhängig voneinander ungesättigtes  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ -  
 oder  $C_{22}$ -Alkylcarbonyl- mit mindestens zwei Doppelbindungen.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz zusätzlich in den Organismus eingebracht wird, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 5 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 10 c) Derivate der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 codieren und eine  $\omega$ 3-Desaturaseaktivität aufweisen.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz zusätzlich in den Organismus eingebracht wird, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 107 oder SEQ ID NO: 109 dargestellten Sequenz, oder
- 20 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 107 oder SEQ ID NO: 109 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.

30 Diese vorgenannten  $\Delta$ -12-Desaturasesequenzen können allein oder in Kombination mit den  $\omega$ 3-Desaturasesequenzen mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen codieren verwendet werden.

Tabelle 1 gibt die Nukleinsäuresequenzen, den Herkunftsorganismus und die Sequenz-ID-Nummer wieder.

Nr.	Organismus	Aktivität	Sequenznummer
1.	<i>Euglena gracilis</i>	$\Delta$ -8-Desaturase	SEQ ID NO: 1
2.	<i>Isochrysis galbana</i>	$\Delta$ -9-Elongase	SEQ ID NO: 3
3.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 5
4.	<i>Ceratodon purpureus</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 7
5.	<i>Physcomitrella patens</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 9
6.	<i>Thraustochytrium</i> sp.	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 11
7.	<i>Mortierella alpina</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 13
8.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 15
9.	<i>Borago officinalis</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 17
10.	<i>Ceratodon purpureus</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 19
11.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 21
12.	<i>Physcomitrella patens</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 23
13.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 25
14.	<i>Physcomitrella patens</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 27
15.	<i>Thraustochytrium</i> sp.	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 29
16.	<i>Phytophthora infestans</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 31
17.	<i>Mortierella alpina</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 33
18.	<i>Mortierella alpina</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 35
19.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 37
20.	<i>Euglena gracilis</i>	$\Delta$ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 39
21.	<i>Thraustochytrium</i> sp.	$\Delta$ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 41
22.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 43
23.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 45
24.	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 47
25.	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 49
26.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 51
27.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 53
28.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 59



Nr.	Organismus	Aktivität	Sequenznummer
29.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 61
30.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 63
31.	<i>Thraustochytrium aureum</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 65
32.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 67
33.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 69
34.	<i>Primula farinosa</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 71
35.	<i>Primula vialii</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 73
36.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 75
37.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 77
38.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 79
39.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 81
40.	<i>Thraustochytrium</i> sp.	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 83
41.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 85
42.	<i>Phytophthora infestans</i>	$\omega$ -3-Desaturase	SEQ ID NO: 87
43.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 89
44.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 91
45.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 93
46.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 95
47.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 97
48.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 99
49.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 101
50.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 103
51.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\omega$ -3-Desaturase	SEQ ID NO: 105
52.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -12-Desaturase	SEQ ID NO: 107
53.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -12-Desaturase	SEQ ID NO: 109
54.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 111
55.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 113
56.	<i>Xenopus laevis</i> (BC044967)	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 117
57.	<i>Ciona intestinalis</i> (AK112719)	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 119

Nr.	Organismus	Aktivität	Sequenznummer
58.	Euglena gracilis	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 131
59.	Euglena gracilis	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 133
60.	Arabidopsis thaliana	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 135
61.	Arabidopsis thaliana	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 137
62.	Phaeodactylum tricornutum	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 183

Die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhaft in Membranlipiden und/oder Triacylglyceriden gebunden, können aber auch als freie Fettsäuren oder aber gebunden in Form anderer Fettsäureester in den Organismen vorkommen. Dabei können sie als "Reinprodukte" oder aber vorteilhaft in Form von Mischungen verschiedener Fettsäuren oder Mischungen unterschiedlicher Glyceride vorliegen. Die in den Triacylglyceriden gebundenen verschiedenen Fettsäuren lassen sich dabei von kurzkettigen Fettsäuren mit 4 bis 6 C-Atomen, mittelkettigen Fettsäuren mit 8 bis 12 C-Atomen oder langkettigen Fettsäuren mit 14 bis 24 C-Atomen ableiten, bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren besonders bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren LCPUFAs von C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester, vorteilhaft mit mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester, besonders vorteilhaft von mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt und führen vorteilhaft zur Synthese von Linolsäure (=LA, C18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup>),  $\gamma$ -Linolensäure (= GLA, C18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup>), Stearidonsäure (= SDA, C18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup>), Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (= DGLA, 20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>),  $\omega$ -3-Eicosatetraensäure (= ETA, C20:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), Arachidonsäure (ARA, C20:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>),  $\omega$ -6-Docosapentaensäure (C22:5 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16</sup>),  $\omega$ -6-Docosatetraensäure (C22:4 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16</sup>),  $\omega$ -3-Docosapentaensäure (= DPA, C22:5 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16,19</sup>), Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16,19</sup>) oder deren Mischungen, bevorzugt ARA, EPA und/oder DHA. Ganz besonders bevorzugt werden,  $\omega$ -3-Fettsäuren wie EPA und/oder DHA hergestellt.

Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen können aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide wie Glycosphingolipide, Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerol, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester wie die AcetylCoenzymA-Ester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten, isoliert werden, vorteilhaft werden sie in der Form ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form des Phosphatidylcholin isoliert, besonders bevorzugt in der Form der

Triacylglyceride. Neben diesen Estern sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch als freie Fettsäuren oder gebunden in anderen Verbindungen in den Organismen vorteilhaft den Pflanzen enthalten. In der Regel liegen die verschiedenen vorgenannten Verbindungen (Fettsäureester und frei Fettsäuren) in den Organismen in einer unge-  
fährten Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% Triglyceride, 2 bis 5 Gew.-% Diglyceride, 5 bis 10 Gew.-% Monoglyceride, 1 bis 5 Gew.-% freie Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% Phospholipide vor, wobei sich die Summe der verschiedenen Verbindungen zu 100 Gew.-% ergänzt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die hergestellten LCPUFAs mit einem Gehalt von mindestens 3 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 5 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 8 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 15 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fettsäuren in den transgenen Organismen vorteilhaft in einer transgenen Pflanze hergestellt. Dabei werden vorteilhaft C<sub>18</sub>- und/oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren, die in den Wirtsorganismen vorhanden sind, zu mindestens 10 %, vorteilhaft zu mindestens 20 %, besonders vorteilhaft zu mindestens 30 %, ganz besonders vorteilhaft zu mindestens 40 % in die entsprechenden Produkte wie DPA oder DHA, um nur zwei beispielhaft zu nennen, umgesetzt. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in gebundener Form hergestellt. Mit Hilfe der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren lassen sich diese ungesättigten Fettsäuren an sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhaft hergestellten Triglyceride bringen. Da im erfindungsgemäßen Verfahren von den Ausgangsverbindungen Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) mehrere Reaktionsschritte durchlaufen werden, fallen die Endprodukte des Verfahrens wie beispielsweise Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA),  $\omega$ -6-Docosapentaensäure oder DHA nicht als absolute Reinprodukte an, es sind immer auch geringe Spuren der Vorstufen im Endprodukt enthalten. Sind in dem Ausgangsorganismus bzw. in der Ausgangspflanze beispielsweise sowohl Linolsäure als auch Linolensäure vorhanden, so liegen die Endprodukte wie ARA, EPA oder DHA als Mischungen vor. Die Vorstufen sollten vorteilhaft nicht mehr als 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht mehr als 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-% bezogen auf die Menge des jeweiligen Endprodukts betragen. Vorteilhaft werden in einer transgenen Pflanze als Endprodukte nur ARA, EPA oder nur DHA im erfindungsgemäßen Verfahren gebunden oder als freie Säuren hergestellt. Werden die Verbindungen ARA, EPA und DHA gleichzeitig hergestellt, werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindesten 1:1:2 (EPA:ARA:DHA), vorteilhaft von mindestens 1:1:3, bevorzugt von 1:1:4, besonders bevorzugt von 1:1:5 hergestellt.

Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, enthalten vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische bevorzugt mindestens



- 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopentendodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diynonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % oder 5 %, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. In einer weiteren bevorzugten Form der Erfindung kommen diese vorgenannten Fettsäuren bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 0,9%; 0,8%; 0,7%; 0,6%; oder 0,5%, besonders bevorzugt zu weniger als 0,4%; 0,3%; 0,2%; 0,1% vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren und/oder keine Buttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5<sup>Δ4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von mindestens 50 %, vorteilhaft von mindestens 80 %, besonders vorteilhaft von mindestens 100 %, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 150 % gegenüber den nicht transgenen Ausgangsorganismus beispielsweise einer Hefe, einer Alge, einem Pilz oder einer Pflanze wie Arabidopsis oder Lein beim Vergleich in der GC-Analyse siehe Beispiele erreicht werden.

Auch chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Fettsäuren oder die Fettsäurezusammensetzungen aus dem Organismus wie den Mikroorganismen oder den Pflanzen oder dem Kulturmedium, in dem oder auf dem die Organismen angezogen wurden, oder aus dem Organismus und dem Kulturmedium in

bekannter Weise beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Methoden isoliert. Diese chemisch reinen Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich der Lebensmittelindustrie, der Kosmetikindustrie und besonders der Pharmaindustrie vorteilhaft.

Als Organismus für die Herstellung im erfindungsgemäßen Verfahren kommen prinzipiell alle Organismen wie Mikroorganismen, nicht-humane Tiere oder Pflanzen in Frage.

Als Pflanzen kommen prinzipiell alle Pflanzen in Frage, die in der Lage sind Fettsäuren zu synthetisieren wie alle dicotylen oder monokotylen Pflanzen, Algen oder Moose. Vorteilhaft Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien Adelotheceaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Crypthecodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrachaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Euglenaceae, Prasinophyceae oder Gemüsepflanzen oder Zierpflanzen wie Tagetes in Betracht.

Beispielhaft seien die folgenden Pflanzen genannt ausgewählt aus der Gruppe: Adelotheceaceae wie die Gattungen *Physcomitrella* z.B. die Gattung und Arten *Physcomitrella patens*, Anacardiaceae wie die Gattungen *Pistacia*, *Mangifera*, *Anacardium* z.B. die Gattung und Arten *Pistacia vera* [Pistazie], *Mangifer indica* [Mango] oder *Anacardium occidentale* [Cashew], Asteraceae wie die Gattungen *Calendula*, *Carthamus*, *Centaurea*, *Cichorium*, *Cynara*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Locusta*, *Tagetes*, *Valeriana* z.B. die Gattung und Arten *Calendula officinalis* [Garten-Ringelblume], *Carthamus tinctorius* [Färberdistel, safflower], *Centaurea cyanus* [Kornblume], *Cichorium intybus* [Wegwarte], *Cynara scolymus* [Artichoke], *Helianthus annuus* [Sonnenblume], *Lactuca sativa*, *Lactuca crisper*, *Lactuca esculenta*, *Lactuca scariola* L. ssp. *sativa*, *Lactuca scariola* L. var. *integrata*, *Lactuca scariola* L. var. *integrifolia*, *Lactuca sativa* subsp. *romana*, *Locusta communis*, *Valeriana locusta* [Salat], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta* oder *Tagetes tenuifolia* [Studentenblume], Apiaceae wie die Gattung *Daucus* z.B. die Gattung und Art *Daucus carota* [Karotte], Betulaceae wie die Gattung *Corylus* z.B. die Gattungen und Arten *Corylus avellana* oder *Corylus colurna* [Haselnuss], Boraginaceae wie die Gattung *Borago* z.B. die Gattung und Art *Borago officinalis* [Borretsch], Brassicaceae wie die Gattungen *Brassica*, *Camelina*, *Melanosinapis*, *Sinapis*, *Arabidopsis* z.B. die Gattungen und Arten *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [Raps], *Sinapis arvensis*, *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Camelina sativa*, *Melanosinapis communis* [Senf], *Brassica oleracea* [Futterrübe] oder *Arabidopsis thaliana*, Bromeliaceae wie die Gattungen *Anana*, *Bromelia* (Ananas) z.B. die Gattungen und Arten *Anana comosus*, *Ananas ananas* oder *Bromelia comosa* [Ananas], Caricaceae wie die Gattung *Carica* wie die Gattung und Art *Carica papaya* [Papaya], Cannabaceae wie die Gattung *Cannabis* wie die Gattung und Art *Cannabis*

- sative [Hanf], Convolvulaceae wie die Gattungen *Ipomea*, *Convolvulus* z.B. die Gattungen und Arten *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* oder *Convolvulus panduratus* [Süßkartoffel, Batate], Chenopodiaceae wie die Gattung Beta wie die Gattungen und Arten *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *Vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris* var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva* oder *Beta vulgaris* var. *esculenta* [Zuckerrübe], Crypthecodiniaceae wie die Gattung Crypthecodinium z.B. die Gattung und Art *Cryptecodinium cohnii*, Cucurbitaceae wie die Gattung Cucurbita z.B. die Gattungen und Arten *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* oder *Cucurbita moschata* [Kürbis], Cymbellaceae wie die Gattungen Amphora, Cymbella, Okedenia, Phaeodactylum, Reimeria z.B. die Gattung und Art *Phaeodactylum tricornutum*, Ditrichaceae wie die Gattungen Ditrichaceae, Astomiopsis, Ceratodon, Chrysoblastella, Ditrichum, Distichium, Eccremidium, Lophidion, Philibertiella, Pleuridium, Saelania, Trichodon, Skottsbergia z.B. die Gattungen und Arten *Ceratodon antarcticus*, *Ceratodon columbiae*, *Ceratodon heterophyllus*, *Ceratodon purpurascens*, *Ceratodon purpureus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *convolutus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *stenocarpus*, *Ceratodon purpureus* var. *rotundifolius*, *Ceratodon ratodon*, *Ceratodon stenocarpus*, *Chrysoblastella chilensis*, *Ditrichum ambiguum*, *Ditrichum brevisetum*, *Ditrichum crispatisimum*, *Ditrichum difficile*, *Ditrichum falcifolium*, *Ditrichum flexicaule*, *Ditrichum giganteum*, *Ditrichum heteromallum*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum pallidum*, *Ditrichum punctulatum*, *Ditrichum pusillum*, *Ditrichum pusillum* var. *tortile*, *Ditrichum rhynchostegium*, *Ditrichum schimperi*, *Ditrichum tortile*, *Distichium capillaceum*, *Distichium hagenii*, *Distichium inclinatum*, *Distichium macounii*, *Eccremidium floridanum*, *Eccremidium whiteleggei*, *Lophidion strictus*, *Pleuridium acuminatum*, *Pleuridium alternifolium*, *Pleuridium holdridgei*, *Pleuridium mexicanum*, *Pleuridium ravenelii*, *Pleuridium subulatum*, *Saelania glaucescens*, *Trichodon borealis*, *Trichodon cylindricus* oder *Trichodon cylindricus* var. *oblongus*, Elaeagnaceae wie die Gattung Elaeagnus z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* [Olive], Ericaceae wie die Gattung Kalmia z.B. die Gattungen und Arten *Kalmia latifolia*, *Kalmia angustifolia*, *Kalmia microphylla*, *Kalmia polifolia*, *Kalmia occidentalis*, *Cistus chamaerhodendros* oder *Kalmia lucida* [Berglorbeer], Euglenaceae wie die Gattungen Ascoglana, Astasia, Colacium, Cyclidiopsis, Euglena, Euglenopsis, Hyalaphacus, Khawkinea, Lepocinclis, Phacus, Strombomonas, Trachelomonas z.B. die Gattung und Art *Euglena gracilis*; Euphorbiaceae wie die Gattungen Manihot, Janipha, Jatropha, Ricinus z.B. die Gattungen und Arten *Manihot utilissima*, *Janipha manihot*, *Jatropha manihot*, *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanobasis*, *Manihot esculenta* [Manihot] oder *Ricinus communis* [Rizinus], Fabaceae wie die Gattungen Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glycine, Dolichos, Phaseolus, Soja z.B. die Gattungen und Arten *Pisum sativum*, *Pisum arvense*, *Pisum humile* [Erbse], *Albizia berteriana*, *Albizia julibrissin*, *Albizia lebbeck*, *Acacia berteriana*, *Acacia littoralis*, *Albizia berteriana*, *Albizia berteriana*, *Cathormion berteriana*, *Feuillea berteriana*, *Inga fragrans*, *Pithecellobium berterianum*, *Pithecellobium fragrans*, *Pithecolobium berterianum*, *Pseudalbizia berteriana*, *Acacia julibrissin*, *Acacia nemu*, *Albizia nemu*, *Feuillea julibrissin*, *Mimosa julibrissin*, *Mimosa speciosa*,



- Sericanrda julibrissin*, *Acacia lebbeck*, *Acacia macrophylla*, *Albizia lebbek*, *Feuilleea lebbeck*, *Mimosa lebbeck*, *Mimosa speciosa* [Seidenbaum], *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Medicago varia* [Alfalfa] *Glycine max* *Dolichos soja*, *Glycine gracilis*, *Glycine hispida*, *Phaseolus max*, *Soja hispida* oder *Soja max* [Sojabohne], Funariaceae wie die Gattungen *Aphanorrhagma*, *Entosthodon*, *Funaria*, *Physcomitrella*, *Physcomitrium* z.B. die Gattungen und Arten *Aphanorrhagma serratum*, *Entosthodon attenuatus*, *Entosthodon bolanderi*, *Entosthodon bonplandii*, *Entosthodon californicus*, *Entosthodon drummondii*, *Entosthodon jamesonii*, *Entosthodon leibergii*, *Entosthodon neoscoticus*, *Entosthodon rubrisetus*, *Entosthodon spathulifolius*, *Entosthodon tucsoni*, *Funaria americana*, *Funaria bolanderi*, *Funaria calcarea*, *Funaria californica*, *Funaria calvescens*, *Funaria convoluta*, *Funaria flavicans*, *Funaria groutiana*, *Funaria hygrometrica*, *Funaria hygrometrica* var. *arctica*, *Funaria hygrometrica* var. *calvescens*, *Funaria hygrometrica* var. *convoluta*, *Funaria hygrometrica* var. *muralis*, *Funaria hygrometrica* var. *utahensis*, *Funaria microstoma*, *Funaria microstoma* var. *obtusifolia*, *Funaria muhlenbergii*, *Funaria orcuttii*, *Funaria plano-convexa*, *Funaria polaris*, *Funaria ravenelii*, *Funaria rubriseta*, *Funaria serrata*, *Funaria sonora*, *Funaria sublimbatus*, *Funaria tucsoni*, *Physcomitrella californica*, *Physcomitrella patens*, *Physcomitrella readeri*, *Physcomitrium australe*, *Physcomitrium californicum*, *Physcomitrium collenchymatum*, *Physcomitrium coloradense*, *Physcomitrium cupuliferum*, *Physcomitrium drummondii*, *Physcomitrium eurytostomum*, *Physcomitrium flexifolium*, *Physcomitrium hookeri*, *Physcomitrium hookeri* var. *serratum*, *Physcomitrium immersum*, *Physcomitrium kellermanii*, *Physcomitrium megalocarpum*, *Physcomitrium pyriforme*, *Physcomitrium pyriforme* var. *serratum*, *Physcomitrium rufipes*, *Physcomitrium sandbergii*, *Physcomitrium subsphaericum*, *Physcomitrium washingtoniense*, Geraniaceae wie die Gattungen *Pelargonium*, *Cocos*, *Oleum* z.B. die Gattungen und Arten *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides* oder *Oleum cocois* [Kokusnuss], Gramineae wie die Gattung *Saccharum* z.B. die Gattung und Art *Saccharum officinarum*, Juglandaceae wie die Gattungen *Juglans*, *Wallia* z.B. die Gattungen und Arten *Juglans regia*, *Juglans ailanthifolia*, *Juglans sieboldiana*, *Juglans cinerea*, *Wallia cinerea*, *Juglans bixbyi*, *Juglans californica*, *Juglans hindsii*, *Juglans intermedia*, *Juglans jamaicensis*, *Juglans major*, *Juglans microcarpa*, *Juglans nigra* oder *Wallia nigra* [Walnuss], Lauraceae Wie die Gattungen *Persea*, *Laurus* z.B. die Gattungen und Arten *Laurus nobilis* [Lorbeer], *Persea americana*, *Persea gratissima* oder *Persea persea* [Avocado], Leguminosae wie die Gattung *Arachis* z.B. die Gattung und Art *Arachis hypogaea* [Erdnuss], Linaceae wie die Gattungen *Linum*, *Adenolinum* z.B. die Gattungen und Arten *Linum usitatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*, *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum pratense* oder *Linum trigynum* [Lein], Lythraeae wie die Gattung *Punica* z.B. die Gattung und Art *Punica granatum* [Granatapfel], Malvaceae wie die Gattung *Gossypium* z.B. die Gattungen und Arten *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* oder *Gossypium thurberi* [Baumwolle], Marchantiaceae wie die Gattung *Marchantia* z.B. die Gattungen und Arten *Marchantia berteriana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, Musaceae wie die Gattung *Musa* z.B. die Gattungen und Arten *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*,



- Musa* spp. [Banane], Onagraceae wie die Gattungen *Camissonia*, *Oenothera* z.B. die Gattungen und Arten *Oenothera biennis* oder *Camissonia brevipes* [Nachtkerze], Palmae wie die Gattung *Elacis* z.B. die Gattung und Art *Elaeis guineensis* [Ölpalme], Papaveraceae wie die Gattung *Papaver* z.B. die Gattungen und Arten *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [Mohn], Pedaliaceae wie die Gattung ..
- 5 *Sesamum* z.B. die Gattung und Art *Sesamum indicum* [Sesam], Piperaceae wie die Gattungen *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia* z.B. die Gattungen und Arten *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe*
- 10 *elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata*. [Cayennepfeffer], Poaceae wie die Gattungen *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Sorghum*, *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea* (Mais), *Triticum* z.B. die Gattungen und Arten *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon*
- 15 *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon.*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum* [Gerste], *Secale cereale* [Roggen], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [Hafer], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum*
- 20 *vulgare*, *Andropogon drummondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aethiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum caffrorum*, *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum subglabrescens*, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum miliaceum*, *Panicum militaceum* [Hirse], *Oryza sativa*, *Oryza latifolia* [Reis], *Zea mays* [Mais]
- 25 *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* oder *Triticum vulgare* [Weizen], Porphyridiaceae wie die Gattungen *Chrootheca*, *Flintiella*, *Petrovanella*, *Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodosorus*, *Vanhoeffenia* z.B. die Gattung und Art *Porphyridium cruentum*, Proteaceae wie die Gattung *Macadamia* z.B. die Gattung und Art *Macadamia integrifolia* [Macadamia],
- 30 Prasinophyceae wie die Gattungen *Nephroselmis*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus* z.B. die Gattungen und Arten *Nephroselmis olivacea*, *Prasinococcus capsulatus*, *Scherffelia dubia*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri*, Rubiaceae wie die Gattung *Coffea* z.B. die Gattungen und Arten *Coffea* spp., *Coffea arabica*, *Coffea canephora* oder *Coffea liberica* [Kaffee], Scrophulariaceae wie die Gattung *Verbascum* z.B. die
- 35 Gattungen und Arten *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum densiflorum*, *Verbascum lagurus*, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lychnitis*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum olympicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum phoenicum*, *Verbascum pulverulentum* oder *Verbascum thapsus* [Königskerze], Solanaceae wie die Gattungen *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon* z.B. die Gattungen und Arten *Capsicum*
- 40 *annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum frutescens* [Pfeffer], *Capsicum annuum* [Paprika], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris* [Tabak], *Solanum tuberosum* [Kartoffel], *Solanum melongena* [Aubergine] *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon*
- 45 *lycopersicum.*, *Lycopersicon pyriforme*, *Solanum integrifolium* oder *Solanum lycopersi-*

*cum* [Tomate], Sterculiaceae wie die Gattung *Theobroma* z.B. die Gattung und Art *Theobroma cacao* [Kakao] oder Theaceae wie die Gattung *Camellia* z.B. die Gattung und Art *Camellia sinensis* [Tee].

- 5 Vorteilhafte Mikroorganismen sind beispielweise Pilze ausgewählt aus der Gruppe der Familien Chaetomiaceae, Choanephoraceae, Cryptococcaceae, Cunninghamellaceae, Dematiaceae, Moniliaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Pythiaceae, Saccharomycetaceae, Saprolegniaceae, Schizosacharomycetaceae, Sodariaceae oder Tuberculariaceae.

- 10 Beispielhaft seien die folgenden Mikroorganismen genannt ausgewählt aus der Gruppe: Choanephoraceae wie den Gattungen *Blakeslea*, *Choanephora* z.B. die Gattungen und Arten *Blakeslea trispora*, *Choanephora cucurbitarum*, *Choanephora infundibulifera* var. *cucurbitarum*, Mortierellaceae wie der Gattung *Mortierella* z.B. die Gattungen und Arten *Mortierella isabellina*, *Mortierella polycephala*, *Mortierella ramanniana*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella zonata*, Pythiaceae wie den Gattungen
- 15 *Phytium*, *Phytophthora* z.B. die Gattungen und Arten *Pythium debaryanum*, *Pythium intermedium*, *Pythium irregulare*, *Pythium megalacanthum*, *Pythium paroecandrum*, *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora lateralis*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora nicotianae* var.
- 20 *parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora syringae*, Saccharomycetaceae wie den Gattungen *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Yarrowia* z.B. die Gattungen und Arten *Hansenula anomala*, *Hansenula californica*, *Hansenula canadensis*, *Hansenula capsulata*, *Hansenula ciferrii*, *Hansenula glucozyma*, *Hansenula henricii*, *Hansenula holstii*, *Hansenula minuta*, *Hansenula nonfermentans*, *Hansenula philodendri*, *Hansenula polymorpha*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula subpelliculosa*, *Hansenula wickerhamii*, *Hansenula*
- 25 *wingei*, *Pichia alcoholophila*, *Pichia angusta*, *Pichia anomala*, *Pichia bisporea*, *Pichia burtonii*, *Pichia canadensis*, *Pichia capsulata*, *Pichia carsonii*, *Pichia cellobiosa*, *Pichia ciferrii*, *Pichia farinosa*, *Pichia fermentans*, *Pichia finlandica*, *Pichia glucozyma*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia haplophila*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia jadinii*, *Pichia lindnerii*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia minuta* var. *minuta*, *Pichia minuta* var. *nonfermentans*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia pastoris*, *Pichia philodendri*, *Pichia pini*, *Pichia polymorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia sargentensis*, *Pichia stipitis*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia subpelliculosa*,
- 30 *Pichia toletana*, *Pichia trehalophila*, *Pichia vini*, *Pichia xylosa*, *Saccharomyces aceti*, *Saccharomyces baillii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces capensis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces drosophilae*, *Saccharomyces elegans*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Saccharomyces hienipiensis*, *Saccharomyces inusitatus*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces*
- 40

kluyveri, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*,  
*Saccharomyces microellipsoides*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces*  
*norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces*  
*pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces*  
 5 *rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Yarrowia lipolytica*,  
 Schizosaccharomycetaceae such as the genera *Schizosaccharomyces* e.g. the species  
*Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*, *Schizosaccharomyces japonicus* var.  
*versatilis*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*,  
*Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*, *Schizosaccharomyces pombe* var.  
 10 *pombe*, Thraustochytriaceae such as the genera *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japono-*  
*chytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* e.g. the species *Schizochytrium aggrega-*  
*tum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium mangrovei*, *Schizochytrium minutum*,  
*Schizochytrium octosporum*, *Thraustochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium amoe-*  
*boideum*, *Thraustochytrium antacticum*, *Thraustochytrium arudimentale*, *Thrausto-*  
 15 *chytrium aureum*, *Thraustochytrium benthicola*, *Thraustochytrium globosum*, *Thrausto-*  
*chytrium indicum*, *Thraustochytrium kerguelense*, *Thraustochytrium kinnei*, *Thrausto-*  
*chytrium motivum*, *Thraustochytrium multirudimentale*, *Thraustochytrium pachyder-*  
*mum*, *Thraustochytrium proliferum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium rossii*,  
*Thraustochytrium striatum* oder *Thraustochytrium visurgense*.

20 Weitere vorteilhafte Mikroorganismen sind beispielweise Bakterien ausgewählt aus der  
 Gruppe der Familien Bacillaceae, Enterobacteriaceae oder Rhizobiaceae.

Beispielhaft seien die folgenden Mikroorganismen genannt ausgewählt aus der  
 Gruppe: Bacillaceae wie die Gattung *Bacillus* z.B die Gattungen und Arten *Bacillus*  
*acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefa-*  
 25 *ciens*, *Bacillus amylolyticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus*  
*coagulans*, *Bacillus sphaericus* subsp. *fusiformis*, *Bacillus galactophilus*, *Bacillus*  
*globisporus*, *Bacillus globisporus* subsp. *marinus*, *Bacillus halophilus*, *Bacillus lenti-*  
*morbis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*,  
*Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*  
 30 subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* oder *Bacillus thuringiensis*; Entero-  
 bacteriaceae wie die Gattungen *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*,  
*Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* oder *Serratia* z.B die Gattungen und Arten *Citro-*  
*bacter amalonaticus*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter geno-*  
*mospecies*, *Citrobacter gillennii*, *Citrobacter intermedium*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter*  
 35 *murlinae*, *Citrobacter* sp., *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella*  
*tarda*, *Erwinia alni*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia ananatis*, *Erwinia aphidicola*, *Erwinia*  
*billingiae*, *Erwinia cacticida*, *Erwinia cancerogena*, *Erwinia carnegieana*, *Erwinia*  
*carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum*, *Erwinia*  
*carotovora* subsp. *odorifera*, *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*, *Erwinia chrysanthemi*,  
 40 *Erwinia cyripedii*, *Erwinia dissolvens*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia mallotivora*,  
*Erwinia milletiae*, *Erwinia nigrifluens*, *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia persicina*, *Erwinia*  
*psidii*, *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia quercina*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia rubrifaciens*,  
*Erwinia salicis*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tracheiphila*, *Erwinia uredovora*, *Escherichia*



- adecarboxylata*, *Escherichia anindolica*, *Escherichia aurescens*, *Escherichia blattae*,  
*Escherichia coli*, *Escherichia coli* var. *communior*, *Escherichia coli-mutabile*, *Escheri-*  
*chia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia sp.*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella*  
*aerogenes*, *Klebsiella edwardsii* subsp. *atlantae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella*  
5 *oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp.  
*pneumoniae*, *Klebsiella sp.*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella trevisanii*, *Salmonella*  
*abony*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp.  
*arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp.  
*choleraesuis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesuis*  
10 subsp. *houtenae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *indica*, *Salmonella choleraesuis*  
subsp. *salamae*, *Salmonella daressalaam*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*,  
*Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*,  
*Salmonella heidelberg*, *Salmonella panama*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella*  
*typhimurium*, *Serratia entomophila*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*,  
15 *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*,  
*Serratia marinorubra*, *Serratia odorifera*, *Serratia plymouthensis*, *Serratia plymuthica*,  
*Serratia proteamaculans*, *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora*, *Serratia quinivo-*  
*rans* oder *Serratia rubidaea*; Rhizobiaceae wie die Gattungen *Agrobacterium*, *Car-*  
*bophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* z.B. die Gattungen und  
20 Arten *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium gelatino-*  
*vorum*, *Agrobacterium larrymoorei*, *Agrobacterium meteori*, *Agrobacterium radiobacter*,  
*Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacte-*  
*rium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Carbophilus carboxidus*, *Chelatobacter heintzii*,  
*Ensifer adhaerens*, *Ensifer arboris*, *Ensifer fredii*, *Ensifer kostiensis*, *Ensifer kummerow-*  
25 *wiae*, *Ensifer medicae*, *Ensifer meliloti*, *Ensifer saheli*, *Ensifer terangae*, *Ensifer*  
*xinjiangensis*, *Rhizobium ciceri* *Rhizobium etli*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium galegae*,  
*Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium huakuii*,  
*Rhizobium huautlense*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium*  
*leguminosarum*, *Rhizobium loessense*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium*  
30 *mediterraneum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium phaseoli*,  
*Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium sullae*,  
*Rhizobium tianshanense*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium undicola*,  
*Rhizobium vitis*, *Sinorhizobium adhaerens*, *Sinorhizobium arboris*, *Sinorhizobium fredii*,  
*Sinorhizobium kostiense*, *Sinorhizobium kummerowiae*, *Sinorhizobium medicae*,  
35 *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium saheli* oder *Sinorhizo-*  
*bium xinjiangense*.

Weitere vorteilhafte Mikroorganismen für das erfindungsgemäße Verfahren sind  
 beispielweise Protisten oder Diatomeen ausgewählt aus der Gruppe der Familien  
 Dinophyceae, Turaniellidae oder Oxytrichidae wie die Gattungen und Arten: *Crypthe-*  
 40 *codinium cohnii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Stylonychia mytilus*, *Stylonychia pustula-*  
*ta*, *Stylonychia putrina*, *Stylonychia notophora*, *Stylonychia sp.*, *Colpidium campylum*  
 oder *Colpidium sp.*



Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Organismen wie Pilze wie *Mortierella* oder *Traustochytrium*, Hefen wie *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, Moose wie *Physcomitrella* oder *Ceratodon*, nicht-humane Tiere wie *Caenorhabditis*, Algen wie *Nephroselmis*, *Pseudoscurfielda*, *Prasinococcus*,  
5 *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Cryptocodinium* oder *Phaeodactylum* oder Pflanzen wie zweikeimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen verwendet. Besonders vorteilhaft werden Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet, die zu den Öl-produzierenden Organismen gehören, das heißt die für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie Pilze wie *Mortierella* oder *Traustochytrium*, Algen wie *Nephroselmis*, *Pseudoscurfielda*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*,  
10 *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Cryptocodinium*, *Phaeodactylum* oder Pflanzen, insbesondere Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor (*Carthamus tinctoria*), Mohn, Senf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica,  
15 Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss oder Walnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee),  
20 *Salix*-Arten sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor, Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind C18:2- und/oder C18:3-Fettsäure reiche Pflanzen wie Sonnenblume, Färberdistel, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis, Mohn, Nachtkerze,  
25 Walnuss, Lein, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein oder Hanf.

Für das erfindungsgemäße beschriebene Verfahren ist es vorteilhaft in den Organismus zusätzlich zu den unter Verfahrensschritt (a) bis (d) eingebrachten Nukleinsäuren  
30 sowie den ggf. eingebrachten Nukleinsäuresequenzen, die für die  $\omega$ -3-Desaturasen codieren, zusätzlich weitere Nukleinsäuren einzubringen, die für Enzyme des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren.

Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels vorteilhaft in Kombination mit der(den) erfinderischen  $\Delta$ -5-Elongase(n),  $\Delta$ -6-Elongase(n) und/oder  
35  $\omega$ -3-Desaturase(n) [im Sinne dieser Anmeldung soll der Plural den Singular und umgekehrt beinhalten] im Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden vorteilhaft werden Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n),  
40 Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) in

Kombination mit der  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase verwendet. Besonders bevorzugt werden Gene ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Desaturasen,  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen oder  $\Delta$ -9-Elongasen in Kombination mit den vorgenannten Genen für die  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase verwendet, wobei einzelne Gene oder mehrere Gene in Kombination verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen  $\Delta$ -5-Elongasen haben gegenüber den humanen Elongasen oder Elongasen aus nicht-humanen Tieren wie denen aus *Oncorhynchus*, *Xenopus* oder *Ciona* die vorteilhafte Eigenschaft, dass sie  $C_{22}$ -Fettsäuren nicht zu den entsprechenden  $C_{24}$ -Fettsäuren elongieren. Weiterhin setzen sie vorteilhaft keine Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position um, wie sie von den humanen Elongasen oder den Elongasen aus nicht-humanen Tieren umgesetzt werden. Besonders vorteilhafte  $\Delta$ -5-Elongasen setzen bevorzugt nur ungesättigte  $C_{20}$ -Fettsäuren um. Diese vorteilhaften  $\Delta$ -5-Elongasen weisen einige putative Transmembran-Helices (5 – 7) auf. Vorteilhaft werden nur  $C_{20}$ -Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -5-Position umgesetzt, wobei  $\omega$ -3- $C_{20}$  Fettsäuren bevorzugt werden (EPA). Weiterhin haben sie in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Eigenschaft, dass sie neben der  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität vorteilhaft keine oder nur eine relativ geringe  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen die humanen Elongasen oder nicht-humanen Tier-Elongasen eine annähernd gleiche Aktivität gegenüber Fettsäuren mit einer  $\Delta$ -6- oder  $\Delta$ -5-Doppelbindung auf. Diese vorteilhaften Elongasen werden als sogenannte monofunktionelle Elongasen bezeichnet. Die humanen Elongasen oder die nicht-humanen Tierelongasen werden dem gegenüber als multifunktionelle Elongasen bezeichnet, die neben den vorgenannten Substraten auch monounsättigte  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ -Fettsäuren beispielsweise mit  $\Delta$ -9- oder  $\Delta$ -11-Doppelbindung umsetzen. Vorteilhaft setzen die monofunktionellen Elongasen in einem Hefefütterungstext, in dem als Substrat EPA den Hefen zugesetzt wurde, mindestens 15 Gew.-% des zugesetzten EPAs zu Docosapentaensäure (DPA,  $C_{22}:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$ ), vorteilhaft mindestens 20 Gew.-%, besonders vorteilhaft mindestens 25 Gew.-% um. Wird als Substrat  $\gamma$ -Linolensäure (= GLA,  $C_{18}:3^{\Delta 6,9,12}$ ) gegeben, so wird diese vorteilhaft gar nicht elongiert. Ebenfalls wird auch  $C_{18}:3^{\Delta 5,9,12}$  nicht elongiert. In einer anderen vorteilhaften Ausführungsform werden weniger als 60 Gew.-% des zugesetzten GLA zu Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (=  $C_{20}:3^{\Delta 8,11,14}$ ) umgesetzt, vorteilhaft weniger als 55 Gew.-%, bevorzugt weniger als 50 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 45 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 40 Gew.-%. In einer weiteren ganz bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität wird GLA nicht umgesetzt.

Die Figuren 27 und 28 geben die gemessenen Substratspezifitäten der verschiedenen Elongasen wieder. In Figur 27 sind die Spezifitäten der multifunktionellen Elongasen von *Xenopus laevis* (Fig. 27 A), *Ciona intestinalis* (Fig. 27 B) und *Oncorhynchus mykiss* (Fig. 27 C) wiedergegeben. Alle diese Elongasen setzen ein breites Spektrum an Substraten um. Dies kann im erfindungsgemäßen Verfahren zu Nebenprodukten führen, die durch weitere enzymatische Aktivitäten umgesetzt werden müssen. Diese Enzyme sind deshalb im erfindungsgemäßen Verfahren weniger bevorzugt. Die

- bevorzugten monofunktionellen Elongasen und ihre Substratspezifität werden in Figur 28 wiedergegeben. Figur 28 A zeigt die Spezifität der *Ostreococcus tauri*  $\Delta$ -5-Elongase. Dies setzt nur Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -5-Position um. Vorteilhaft werden nur C20-Fettsäuren umgesetzt. Eine ähnlich hohe Substratspezifität weist die  $\Delta$ -5-Elongase von *Thalassiosira pseudonana* (Fig. 28. C) auf. Sowohl die  $\Delta$ -6-Elongase von *Ostreococcus tauri* (Fig. 28 B) als auch die von *Thalassiosira pseudonana* (Fig. 28 D) setzen vorteilhaft nur Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position um. Vorteilhaft werden nur C18-Fettsäuren umgesetzt. Auch die  $\Delta$ -5-Elongasen aus *Arabidopsis thaliana* und *Euglena gracilis* zeichnen sich durch ihre Spezifität aus.
- 10 Vorteilhafte erfindungsgemäße  $\Delta$ -6-Elongasen zeichnen sich ebenfalls durch eine hohe Spezifität aus, das heißt bevorzugt werden C<sub>18</sub>-Fettsäuren elongiert. Vorteilhaft setzen sie Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position um. Besonders vorteilhafte  $\Delta$ -6-Elongasen setzen vorteilhaft C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit drei oder vier Doppelbindungen im Molekül um, wobei diese eine Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position enthalten müssen.
- 15 Weiterhin haben sie in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Eigenschaft, dass sie neben der  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität vorteilhaft keine oder nur eine relativ geringe  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen die humanen Elongasen oder nicht-humanen Tier-Elongasen eine annähernd gleiche Aktivität gegenüber Fettsäuren mit einer  $\Delta$ -6- oder  $\Delta$ -5-Doppelbindung auf. Diese vorteilhaften
- 20 Elongasen werden als sogenannte monofunktionelle Elongasen bezeichnet. Die humanen Elongasen oder die nicht-humanen Tierelongasen werden, wie oben beschrieben, dem gegenüber als multifunktionelle Elongasen bezeichnet, die neben den vorgenannten Substraten auch monounsättigte C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Fettsäuren beispielsweise mit  $\Delta$ -9- oder  $\Delta$ -11-Doppelbindung umsetzen. Vorteilhaft setzen die
- 25 monofunktionellen Elongasen in einem Hefefütterungstext, in dem als Substrat EPA den Hefen zugesetzt wurde, mindestens 10 Gew.-% der zugesetzten  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA, C<sub>18</sub>:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup>) bzw. mindestens 40 Gew.-% der zugesetzten  $\gamma$ -Linolensäure (= GLA, C<sub>18</sub>:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup>), vorteilhaft mindestens 20 Gew.-% bzw. 50 Gew.-%, besonders vorteilhaft mindestens 25 Gew.-% bzw. 60 Gew.-% um. Besonders vorteilhaft wird
- 30 auch C<sub>18</sub>:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup> (Stearidonsäure) elongiert. SDA wird dabei zu mindestens 40 Gew.-%, vorteilhaft zu mindestens 50 Gew.-%, besonders vorteilhaft zu mindestens 60 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft zu mindestens 70 Gew.-% umgesetzt. Besonders vorteilhafte  $\Delta$ -6-Elongasen zeigen keine oder nur eine sehr geringe Aktivität (weniger als 0,1 Gew.-% Umsatz) gegenüber den folgenden Substraten: C<sub>18</sub>:1 <sup>$\Delta$ 6</sup>, C<sub>18</sub>:1 <sup>$\Delta$ 9</sup>, C<sub>18</sub>:1 <sup>$\Delta$ 11</sup>, C<sub>20</sub>:2 <sup>$\Delta$ 11,14</sup>, C<sub>20</sub>:3 <sup>$\Delta$ 11,14,17</sup>, C<sub>20</sub>:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>, C<sub>20</sub>:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>, C<sub>20</sub>:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup> oder C<sub>22</sub>:4 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16</sup>.
- 35

Die Figuren 29 und 30 sowie die Tabelle 18 geben die gemessenen Substratspezifitäten der verschiedenen Elongasen wieder.

- 40 Die erfindungsgemäße  $\omega$ -3-Desaturase hat gegenüber den bekannten  $\omega$ -3-Desaturase die vorteilhafte Eigenschaft, dass sie ein breites Spektrum an  $\omega$ -6-Fettsäuren desaturieren kann, bevorzugt werden C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Fettsäuren wie C<sub>20</sub>:2<sup>-</sup>, C<sub>20</sub>:3<sup>-</sup>, C<sub>20</sub>:4<sup>-</sup>, C<sub>22</sub>:4<sup>-</sup> oder C<sub>22</sub>:5<sup>-</sup>-Fettsäuren desaturiert. Aber auch die kürzeren C<sub>18</sub>-Fettsäuren wie C<sub>18</sub>:2<sup>-</sup>



- oder C<sub>18:3</sub>-Fettsäuren werden vorteilhaft desaturiert. Durch diese Eigenschaften der  $\omega$ -3-Desaturase ist es vorteilhaft möglich das Fettsäurespektrum innerhalb eines Organismus vorteilhaft innerhalb einer Pflanze oder einem Pilz von den  $\omega$ -6-Fettsäuren zu den  $\omega$ -3-Fettsäuren hin zu verschieben. Bevorzugt werden von der erfindungsgemäßen  $\omega$ -3-Desaturase C<sub>20</sub>-Fettsäuren desaturiert. Innerhalb des Organismus werden diese Fettsäuren aus dem vorhandenen Fettsäurepool zu mindestens 10%, 15%, 20%, 25% oder 30% zu den entsprechenden  $\omega$ -3-Fettsäuren umgesetzt. Gegenüber den C<sub>18</sub>-Fettsäuren weist die  $\omega$ -3-Desaturase eine um den Faktor 10 geringere Aktivität auf, das heißt es werden nur ca. 1,5 bis 3% der im Fettsäurepool vorhandenen Fettsäuren zu den entsprechenden  $\omega$ -3-Fettsäuren umgesetzt. Bevorzugtes Substrat der erfindungsgemäßen  $\omega$ -3-Desaturase sind die in Phospholipiden gebundenen  $\omega$ -6-Fettsäuren. Figur 19 zeigt deutlich am Beispiel der Desaturierung von Dihomo- $\gamma$ -linolensäure [C<sub>20:4</sub> <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>], dass die  $\omega$ -3-Desaturase bei der Desaturierung vorteilhaft nicht zwischen an sn1- oder sn2-Position gebundenen Fettsäuren unterscheidet. Sowohl an sn1- oder sn2-Position in den Phospholipide gebundene Fettsäuren werden desaturiert. Weiterhin ist vorteilhaft, dass die  $\omega$ -3-Desaturase eine breite Palette von Phospholipiden wie Phosphatidylcholin (= PC), Phosphatidylinositol (= PIS) oder Phosphatidylethanolamin (= PE) umsetzt. Schließlich lassen sich auch Desaturierungsprodukte in den Neutrallipiden (= NL), das heißt in den Triglyceriden finden.
- Die erfindungsgemäßen  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen und  $\Delta$ -6-Desaturasen haben gegenüber den bekannten  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen und  $\Delta$ -6-Desaturasen den Vorteil, dass sie Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft CoA-Fettsäureester umsetzen können.
- Vorteilhaft setzen die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen Ölsäure (C<sub>18:1</sub> <sup>$\Delta$ 9</sup>) zu Linolsäure (C<sub>18:2</sub> <sup>$\Delta$ 9,12</sup>) oder C<sub>18:2</sub> <sup>$\Delta$ 6,9</sup> zu C<sub>18:3</sub> <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup> (= GLA) um. Vorteilhaft setzen die verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft gebunden an CoA-Fettsäureester um.
- Durch die enzymatische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie weiteren Polypeptiden mit  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6-,  $\Delta$ -8-,  $\Delta$ -12-Desaturase- oder  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6- oder  $\Delta$ -9-Elongaseaktivität codieren, können unterschiedlichste mehrfach ungesättigte Fettsäuren im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden. Je nach Auswahl der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Organismen wie den vorteilhaften Pflanzen lassen sich Mischungen der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA oder ARA in freier oder gebundener Form herstellen. Je nachdem welche Fettsäurezusammensetzung in der Ausgangspflanze vorherrscht (C<sub>18:2</sub>- oder C<sub>18:3</sub>-Fettsäuren) entstehen so Fettsäuren, die sich von C<sub>18:2</sub>-Fettsäuren ableiten, wie GLA, DGLA oder ARA oder, die sich von C<sub>18:3</sub>-Fettsäuren ableiten, wie SDA, ETA oder EPA. Liegt in der für das Verfahren



verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur Linolsäure (= LA, C18:2<sup>Δ9,12</sup>) vor, so können als Produkte des Verfahrens nur GLA, DGLA und ARA entstehen, die als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Ist in der im Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur α-Linolensäure (= ALA, C18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) beispielsweise wie in Lein, so können als Produkte des Verfahrens nur SDA, ETA, EPA und/oder DHA entstehen, die wie oben beschrieben als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Durch Modifikation der Aktivität des an der Synthese beteiligten Enzyms Δ-5-Elongase vorteilhaft in Kombination mit der Δ-4-, Δ-5-, Δ-6-, Δ-12-Desaturase und/oder Δ-6-Elongase, oder der Δ-4-, Δ-5-, Δ-8-, Δ-12-Desaturase, und/oder Δ-9-Elongase lassen sich gezielt in den vorgenannten Organismen vorteilhaft in den vorgenannten Pflanzen nur einzelne Produkte herstellen. Durch die Aktivität der Δ-6-Desaturase und Δ-6-Elongase entstehen beispielsweise GLA und DGLA bzw. SDA und ETA, je nach Ausgangspflanze und ungesättigter Fettsäure. Bevorzugt entstehen DGLA bzw. ETA oder deren Mischungen. Werden die Δ-5-Desaturase, die Δ-5-Elongase und die Δ-4-Desaturase zusätzlich in die Organismen vorteilhaft in die Pflanze eingebracht, so entstehen zusätzlich ARA, EPA und/oder DHA. Dies gilt auch für Organismen in die vorher die Δ-8-Desaturase und Δ-9-Elongase eingebracht wurde. Vorteilhaft werden nur ARA, EPA oder DHA oder deren Mischungen synthetisiert, abhängig von der in im Organismus bzw. in der Pflanze vorliegenden Fettsäure, die als Ausgangssubstanz für die Synthese dient. Da es sich um Biosyntheseketten handelt, liegen die jeweiligen Endprodukte nicht als Reinsubstanzen in den Organismen vor. Es sind immer auch geringe Mengen der Vorläuferverbindungen im Endprodukt enthalten. Diese geringen Mengen betragen weniger als 20 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 15 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 10 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 5, 4, 3, 2 oder 1 Gew.-% bezogen auf das Endprodukt DGLA, ETA oder deren Mischungen bzw. ARA, EPA, DHA oder deren Mischungen vorteilhaft EPA oder DHA oder deren Mischungen.

Das von der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodierte Protein zeigt eine hohe Spezifität für die beiden Vorstufen C18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>- und C20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>-Fettsäuren zur Synthese von DHA (Vorstufen und Synthese von DHA siehe Figur 1). Das von SEQ NO: 53 kodierte Protein hat damit eine Spezifität für Δ6- und Δ5-Fettsäuren mit zusätzlich einer ω3-Doppelbindung (Figur 2). Die Δ-5-Elongase hat eine keto-Acyl-CoA-Synthase-Aktivität, die vorteilhaft Fettsäurereste von Acyl-CoA-Estern um 2 Kohlenstoffatome verlängert.

Mittels der Δ-5-Elongase-Gene, der Δ5-Desaturase aus *Phaeodacylum* sowie der Δ4-Desaturase aus *Euglena* konnte die Synthese von DHA in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) nachgewiesen werden (Figur 3).

Neben der Produktion der Ausgangsfettsäuren für die erfindungsgemäße Δ-5-Elongase, Δ-6-Elongase und/oder ω-3-Desaturase direkt im Organismus können die Fettsäuren auch von außen gefüttert werden. Aus Kostengründen ist die Produktion im Organismus bevorzugt. Bevorzugt Substrate der ω-3-Desaturase sind die Linolsäure (C18:2<sup>Δ9,12</sup>), die γ-Linolensäure (C18:3<sup>Δ6,9,12</sup>), die Eicosadiensäure (C20:2<sup>Δ11,14</sup>), die

Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (C20:3 $\Delta^{8,11,14}$ ), die Arachidonsäure (C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ ), die Docosatetraensäure (C22:4 $\Delta^{7,10,13,16}$ ) und die Docosapentaensäure (C22:5 $\Delta^{4,7,10,13,15}$ ).

Zur Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist es vorteilhaft die Menge an Ausgangsprodukt für die Fettsäuresynthese zu steigern, dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure in den Organismus, die für ein Polypeptid mit  $\Delta$ -12-Desaturase codiert, erreicht werden. Dies ist besonders vorteilhaft in Öl-produzierenden Organismen wie der Familie der Brassicaceae wie der Gattung Brassica z.B. Raps; der Familie der Elaeagnaceae wie die Gattung Elaeagnus z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* oder der Familie Fabaceae wie der Gattung Glycine z.B. die Gattung und Art *Glycine max*, die einen hohen Ölsäuregehalt aufweisen. Da diese Organismen nur einen geringen Gehalt an Linolsäure aufweisen (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681) ist die Verwendung der genannten  $\Delta$ -12-Desaturasen zur Herstellung des Ausgangsprodukts Linolsäure vorteilhaft.

Im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren stammen vorteilhaft aus Pflanzen wie Algen beispielsweise Algen der Familie der Prasinophyceae wie aus den Gattungen Heteromastix, Mammella, Mantoniella, Micromonas, Nephroselmis, Ostreococcus, Prasinocladus, Prasinococcus, Pseudoscurfielda, Pycnococcus, Pyramimonas, Scherffelia oder Tetraselmis wie den Gattungen und Arten Heteromastix longifillis, Mamiella gilva, Mantoniella squamata, Micromonas pusilla, Nephroselmis olivacea, Nephroselmis pyriformis, Nephroselmis rotunda, Ostreococcus tauri, Ostreococcus sp. Prasinocladus ascus, Prasinocladus lubricus, Pycnococcus provasolii, Pyramimonas amyliifera, Pyramimonas disomata, Pyramimonas obovata, Pyramimonas orientalis, Pyramimonas parkeae, Pyramimonas spinifera, Pyramimonas sp., Tetraselmis apiculata, Tetraselmis carteriformis, Tetraselmis chui, Tetraselmis convolutae, Tetraselmis desikacharyi, Tetraselmis gracilis, Tetraselmis hazeni, Tetraselmis impellucida, Tetraselmis inconspicua, Tetraselmis levis, Tetraselmis maculata, Tetraselmis marina, Tetraselmis striata, Tetraselmis subcordiformis, Tetraselmis suecica, Tetraselmis tetrabrachia, Tetraselmis tetrathele, Tetraselmis verrucosa, Tetraselmis verrucosa fo. rubens oder Tetraselmis sp. oder aus Algen der Familie Euglenaceae wie aus den Gattungen Ascoglena, Astasia, Colacium, Cyclidiopsis, Euglena, Euglenopsis, Hyalophacus, Khawkinia, Lepocinclis, Phacus, Strombomonas oder Trachelomonas wie die Gattungen und Art Euglena acus, Euglena geniculata, Euglena gracilis, Euglena mixocylindracea, Euglena rostrifera, Euglena viridis, Colacium stentorium, Trachelomonas cylindrica oder Trachelomonas volvocina. Vorteilhaft stammen die verwendeten Nukleinsäuren aus Algen der Gattungen Euglena, Mantoniella oder Ostreococcus.

Weitere vorteilhafte Pflanzen sind Algen wie Isochrysis oder Crypthecodinium, Algen/Diatomeen wie Thalassiosira oder Phaeodactylum, Moose wie Physcomitrella o-

der Ceratodon oder höheren Pflanzen wie den Primulaceae wie *Aleuritia*, *Calendula stellata*, *Osteospermum spinescens* oder *Osteospermum hyoseroides*, Mikroorganismen wie Pilzen wie *Aspergillus*, *Thraustochytrium*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* oder *Mortierella*, Bakterien wie *Shewanella*, Hefen oder Tieren wie Nematoden wie *Caenorhabditis*, Insekten, Fröschen, Seegurken oder Fischen. Vorteilhaft stammen die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Tier aus der Ordnung der Vertebraten. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Klasse der Vertebrata; Euteleostomi, Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes; Salmonidae bzw. *Oncorhynchus* oder Vertebrata, Amphibia, Anura, Pipidae, *Xenopus* oder Evertabrata wie Protochordata, Tunicata, Holothuroidea, Cionidae wie *Amaroucium constellatum*, *Botryllus schlosseri*, *Ciona intestinalis*, *Molgula citrina*, *Molgula manhattensis*, *Perophora viridis* oder *Styela partita*. Besonders vorteilhaft stammen die Nukleinsäuren aus Pilzen, Tieren oder aus Pflanzen wie Algen oder Moosen, bevorzugt aus der Ordnung der Salmoniformes wie der Familie der Salmonidae wie der Gattung *Salmo* beispielsweise aus den Gattungen und Arten *Oncorhynchus mykiss*, *Trutta trutta* oder *Salmo trutta fario*, aus Algen wie den Gattungen *Mantoniella* oder *Ostreococcus* oder aus den Diatomeen wie den Gattungen *Thalassiosira* oder *Phaeodactylum* oder aus Algen wie *Cryptocodinium*.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen oder deren Derivat oder Homologe, die für Polypeptide codieren, die noch die enzymatische Aktivität der durch Nukleinsäuresequenzen codierten Proteine besitzen. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codierenden Nukleinsäuresequenzen in Expressionskonstrukte cloniert und zum Einbringen und zur Expression in Organismen verwendet. Diese Expressionskonstrukte ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle oder eines ganzen Organismus, der die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei die Zelle und/oder der Organismus mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codiert, einem Genkonstrukt oder einem Vektor wie nachfolgend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipidsstoffwechsels codieren, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus dem Organismus oder aus der Kultur. Bei der Kultur kann es sich beispielsweise um eine Fermentationskultur beispielsweise im Falle der Kultivierung von Mikroorganismen wie z.B. *Mortierella*, *Thalassiosira*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Saccharomyces* oder *Thraustochytrium* oder



um eine Treibhaus oder Feldkultur einer Pflanze handeln. Die so hergestellte Zelle oder der so hergestellte Organismus ist vorteilhaft eine Zelle eines Öl-produzierenden Organismus wie einer Ölfruchtpflanze wie beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Safflower, Hanf, Sonnenblumen oder Borretsch.

- 5 Unter Anzucht ist beispielsweise die Kultivierung im Falle von Pflanzenzellen, -gewebe oder -organe auf oder in einem Nährmedium oder der ganzen Pflanze auf bzw. in einem Substrat beispielsweise in Hydrokultur, Blumentopferde oder auf einem Ackerboden zu verstehen.

- 10 "Transgen" bzw. "Rekombinant" im Sinne der Erfindung bedeutet bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder

- 15 a) die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, oder  
b) eine mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder  
c) (a) und (b)

- 20 sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen genomischen bzw. chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit den entsprechenden  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -5-Elongasegenen – wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

Unter transgenen Organismus bzw. transgener Pflanze im Sinne der Erfindung ist wie vorgenannt zu verstehen, dass die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an



ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch wie genannt, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen

5 Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Organismen sind Pilze wie *Mortierella* oder *Phytophthora*,

10 Moose wie *Physcomitrella*, Algen wie *Mantoniella*, *Euglena*, *Cryptocodinium* oder *Ostreococcus*, Diatomeen wie *Thalassiosira* oder *Phaeodactylum* oder Pflanzen wie die Ölfuchtpflanzen.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die Expressionskassette oder den Vektor eignen sich

15 prinzipiell vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie *Arabidopsis*, *Asteraceae* wie *Calendula* oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, FärberSaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Thraustochytrium*, *Saprolegnia*, *Phytophthora* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia* oder *Shewanella*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Cyanobakterien, Ciliaten, Algen wie *Mantoniella*, *Euglena*, *Thalassiosira* oder *Ostreococcus* oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptocodinium* genannt. Bevorzugt werden

20 Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum*, *Phytophthora infestans* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, FärberSaflor, Flachs, Hanf, Rizinus, *Calendula*, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Flachs, Raps, FärberSaflor, Sonnenblume,

25 *Calendula*, *Mortierella* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen neben den vorgenannten transgenen Organismen auch transgene Tiere vorteilhaft nicht-humane Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*, *Ciona intestinalis* oder *Xenopus laevis*.

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

35

Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

Hierzu gehören Pflanzenzellen und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von

40 Pflanzen in all ihren Erscheinungsformen, wie Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotyledonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe,

reproduktives Gewebe und Zellkulturen, das von der eigentlichen transgenen Pflanze abgeleitet ist und/oder dazu verwendet werden kann, die transgene Pflanze hervorzubringen.

Transgene Pflanzen, die die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, können vorteilhaft direkt vermarktet werden ohne dass die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen. Unter Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren sind ganze Pflanzen sowie alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile wie Blatt, Stiel, Samen, Wurzel, Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotyledonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe, Zellkulturen, die sich von der transgenen Pflanze abgeleiten und/oder dazu verwendet werden können, die transgene Pflanze hervorzubringen. Der Samen umfasst dabei alle Samenteile wie die Samenhüllen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder Embryogewebe. Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen können aber auch aus den Organismen vorteilhaft Pflanzen in Form ihrer Öle, Fett, Lipide und/oder freien Fettsäuren isoliert werden. Durch dieses Verfahren hergestellte mehrfach ungesättigten Fettsäuren lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder vom Feld ernten. Dies kann über Pressen oder Extraktion der Pflanzenteile bevorzugt der Pflanzensamen erfolgen. Dabei können die Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren durch sogenanntes kalt schlagen oder kalt pressen ohne Zuführung von Wärme durch Pressen gewonnen werden. Damit sich die Pflanzenteile speziell die Samen leichter aufschließen lassen, werden sie vorher zerkleinert, gedämpft oder geröstet. Die so vorbehandelten Samen können anschließend gepresst werden oder mit Lösungsmittel wie warmen Hexan extrahiert werden. Anschließend wird das Lösungsmittel wieder entfernt. Im Falle von Mikroorganismen werden diese nach Ernte beispielsweise direkt ohne weitere Arbeitsschritte extrahiert oder aber nach Aufschluss über verschiedene dem Fachmann bekannte Methoden extrahiert. Auf diese Weise können mehr als 96 % der im Verfahren hergestellten Verbindungen isoliert werden. Anschließend werden die so erhaltenen Produkte weiter bearbeitet, das heißt raffiniert. Dabei werden zunächst beispielsweise die Pflanzenschleime und Trübstoffe entfernt. Die sogenannte Entschleimung kann enzymatisch oder beispielsweise chemisch/physikalisch durch Zugabe von Säure wie Phosphorsäure erfolgen. Anschließend werden die freien Fettsäuren durch Behandlung mit einer Base beispielsweise Natronlauge entfernt. Das erhaltene Produkt wird zur Entfernung der im Produkt verbliebenen Lauge mit Wasser gründlich gewaschen und getrocknet. Um die noch im Produkt enthaltenen Farbstoffe zu entfernen werden die Produkte einer Bleichung mit beispielsweise Bleicherde oder Aktivkohle unterzogen. Zum Schluss wird das Produkt noch beispielsweise mit Wasserdampf noch desodoriert.

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs bzw. LCPUFAs  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - oder  $C_{22}$ -Fettsäuremoleküle vorteilhaft  $C_{20}$ - oder  $C_{22}$ -Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - oder  $C_{22}$ -Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren.

Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

Eine Ausführungsform der Erfindung sind deshalb Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

Diese Öle, Lipide oder Fettsäuren enthalten wie oben beschrieben vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische bevorzugt mindestens 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopenten-dodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diynonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % oder 5 %, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. In einer weiteren bevorzugten Form der Erfindung kommen diese vorgenannten Fettsäuren bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 0,9%; 0,8%; 0,7%; 0,6%; oder 0,5%, besonders bevorzugt zu weniger als 0,4%; 0,3%; 0,2%; 0,1% vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren und/oder keine Butterbuttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (=



Docosapentaensäure, C22:5<sup>Δ4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäßen Öle, Lipide oder Fettsäuren mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% oder 5%, vorteilhaft mindestens 6%, 7%, 8%, 9% oder 10%,  
5 besonders vorteilhaft mindestens 11%, 12%, 13%, 14% oder 15% ARA oder mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% oder 5%, vorteilhaft mindestens 6%, oder 7%, besonders vorteilhaft mindestens 8%, 9% oder 10% EPA und/oder DHA bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt des Produktionsorganismus vorteilhaft einer Pflanze, besonders vorteilhaft einer Ölfruchtpflanze wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färberraffin,  
10 safflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne, Sonnenblume oder den oben genannten weiteren ein- oder zweikeimblättrigen Ölfruchtpflanzen.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. Die erfindungsgemäßen Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische können in der dem Fachmann bekannten Weise zur  
15 Abmischung mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs wie z.B. Fischölen verwendet werden. Auch diese Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische, die aus pflanzlichen und tierischen Bestandteilen bestehen, können zur Herstellung von Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder  
20 Pharmazeutika verwendet werden.

Unter dem Begriff "Öl", "Lipid" oder "Fett" wird ein Fettsäuregemisch verstanden, das ungesättigte, gesättigte, vorzugsweise veresterte Fettsäure(n) enthält. Bevorzugt ist, dass das Öl, Lipid oder Fett einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten freien oder vorteilhaft veresterten Fettsäure(n), insbesondere Linolsäure, γ-Linolensäure, Dihomo-  
25 γ-linolensäure, Arachidonsäure, α-Linolensäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure hat. Vorzugsweise ist der Anteil an ungesättigten veresterten Fettsäuren ungefähr 30 %, mehr bevorzugt ist ein Anteil von 50 %, noch mehr bevorzugt ist ein Anteil von 60 %, 70 %, 80 % oder mehr. Zur Bestimmung kann z.B. der Anteil an Fettsäure nach Überführung  
30 der Fettsäuren in die Methylester durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. Calendulasäure, Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Ölsäure etc., enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangsorganismus der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.

35 Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, handelt es sich wie oben beschrieben beispielsweise um Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder sonstige Fettsäureester.

40 Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren beispielsweise über eine Alkali-

behandlung beispielsweise wäßrige KOH oder NaOH oder saure Hydrolyse vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol oder über eine enzymatische Abspaltung freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließender Ansäuerung über z.B.  $H_2SO_4$ . Die Freisetzung der Fettsäuren kann auch  
5 direkt ohne die vorhergehend beschriebene Aufarbeitung erfolgen.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder auf einem separaten Plasmid liegen oder vorteilhaft in das Genom der Wirtszelle integriert sein. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige  
10 Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell  
15 transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist. Vorteilhaft werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multiparallelen Expression in die Organismen vorteilhaft zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genen in die Pflanzen gebracht.

Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche  
20 Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFAs in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraction akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen  
25 isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraction akkumulieren, besonders vorteilhaft für das erfindungsgemäße Verfahren und damit zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Hanf, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar.

Als Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität codieren, und/oder den weiteren verwendeten Nukleinsäuren wie den Nukleinsäuren, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels  
35 ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n)  
40 codieren eignen sich vorteilhaft  $C_{16}$ -,  $C_{18}$ - oder  $C_{20}$ -Fettsäuren. Bevorzugt werden die

im Verfahren als Substrate umgesetzten Fettsäuren in Form ihrer Acyl-CoA-Ester und/oder ihrer Phospholipid-Ester umgesetzt.

5 Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettigen PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase zunächst desaturiert und anschließend über eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C<sub>20</sub>-Fettsäuren, und nach zwei Elongationsrunden zu C<sub>22</sub>-Fettsäuren. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen und Elongasen führt vorzugsweise zu C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren vorteilhaft mit mindestens 10 zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, ganz besonders bevorzugt mit fünf oder sechs Doppelbindungen im Molekül. Nachdem eine erste Desaturierung und die Verlängerung stattgefunden hat, können weitere Desaturierungs- und Elongierungsschritte wie 15 z.B. eine solche Desaturierung in  $\Delta$ -5- und  $\Delta$ -4-Position erfolgen. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure. Die C<sub>20</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können 20 durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Der bevorzugte Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen, Lipiden oder Fette in den vorteilhaft verwendeten Pflanzen ist beispielsweise im allgemeinen der Samen oder 25 Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, dass die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muss, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.

30 Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismus wie Hefen wie *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, Pilze wie *Mortierella*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* oder *Thraustochytrium* Algen wie *Isochrysis*, *Mantoniella*, *Euglena*, *Ostreococcus*, *Phaeodactylum* oder *Cryptocodinium* verwendet, so werden diese Organismen vorteilhaft fermentativ angezogen.

35 Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für eine  $\Delta$ -5-Elongase codieren, können im Verfahren die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens um 5 %, bevorzugt mindestens um 10 %, besonders bevorzugt mindestens um 20 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50 % gegenüber dem Wildtyp der Organismen, die die Nukleinsäuren nicht rekombinant enthalten, erhöht 40 werden.



Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den im Verfahren verwendeten Organismen prinzipiell auf zwei Arten erhöht werden. Es kann vorteilhaft der Pool an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder der Anteil der über das Verfahren hergestellten veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöht werden. Vorteilhaft wird durch das erfindungsgemäße Verfahren der Pool an veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den transgenen Organismen erhöht.

Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismen verwendet, so werden sie je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren können nach dem Fachmann bekannten Verfahren wie oben beschrieben aus den Organismen isoliert werden. Beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, ggf. Salzfällung und/oder Chromatographie. Die Organismen können dazu vorher noch vorteilhaft aufgeschlossen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird, wenn es sich bei den Wirtsorganismen um Mikroorganismen handelt, vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 95°, bevorzugt zwischen 10°C bis 85°C, besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 75°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 45°C durchgeführt.

Der pH-Wert wird dabei vorteilhaft zwischen pH 4 und 12, bevorzugt zwischen pH 6 und 9, besonders bevorzugt zwischen pH 7 und 8 gehalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der merican Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen wie oben beschrieben gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

- 5 Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere
- 10 mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und/oder Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und/oder Linolsäure, Alkohole und/oder Polyalkohole wie z. B. Glycerin, Methanol und/oder Ethanol und/oder organische Säuren wie z.B. Essigsäure und/oder Milchsäure.
- 15 Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak in flüssiger- oder gasform oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie
- 20 Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

- 25 Als Schwefelquelle für die Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.
- 30 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

- 35 Die erfindungsgemäß zur Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt,

Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

10 Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

15 Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht durch Zugabe von basischen Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder sauren Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z.B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt 25 normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

30 Die so erhaltenen, insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthaltenden, Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

35 Die Fermentationsbrühe kann anschließend weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Vorteilhaft wird die Biomasse nach Abtrennung aufgearbeitet.

40 Die Fermentationsbrühe kann aber auch ohne Zellabtrennung mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann schließlich zur Gewinnung der darin enthaltenen Fettsäuren aufgearbeitet werden.



Die im Verfahren gewonnenen Fettsäuren eignen sich auch als Ausgangsmaterial für die chemische Synthese von weiteren Wertprodukten. Sie können beispielsweise in Kombination miteinander oder allein zur Herstellung von Pharmaka, Nahrungsmittel, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

- 5 Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongase codieren, wobei die durch die Nukleinsäuresequenzen codierten  $\Delta$ -5-Elongasen  $C_{20}$ -Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen im Fettsäuremolekül umsetzen; die vorteilhaft letztlich in Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride eingebaut werden.
- 10 Vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codieren und die eine Aminosäuresequenz enthalten ausgewählt aus der Gruppe einer Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141 oder SEQ ID NO: 142 dargestellten Sequenz.
- 15 Weitere vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codieren und die eine Kombination der Aminosäuresequenzen enthalten ausgewählt aus der Gruppe:
  - a) SEQ ID NO: 115 und SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 115 und SEQ ID NO: 140 oder SEQ ID NO: 139 und SEQ ID NO: 140; oder
  - 20 b) SEQ ID NO: 116 und SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 116 und SEQ ID NO: 142 oder SEQ ID NO: 141 und SEQ ID NO: 142; oder
  - c) SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 139 und SEQ ID NO: 140 oder SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 141 und SEQ ID NO: 142.

- 25 Die in den Sequenzen SEQ ID NO: 115 (NXXXHXXMYXYYX), SEQ ID NO: 116 (HHXXXWAWW), SEQ ID NO: 139 (LHXXHH), SEQ ID NO: 140 (TXXQXXQF), SEQ ID NO: 141 (DTXFMV) und SEQ ID NO: 142 (TQAQXXQF) wiedergegebenen Sequenzen stellen konservierte Bereiche der verschiedenen Elongasen wieder. Tabelle 2 gibt die Bedeutung der in den genannten Nukleinsäuresequenzen enthaltenen mit X bezeichneten Aminosäuren wieder (Spalte 3). Auch die bevorzugten Aminosäuren in
- 30 den verschiedenen Positionen sind der Tabelle zu entnehmen (Spalte 3). Spalte 1 gibt die SEQ ID NO wieder, Spalte 2 die Position in der Sequenz.

Tabelle 2: Bedeutung der mit X bezeichneten Aminosäure in den Konsensus-Sequenzen.

SEQ ID NO: ...	Position des X in der Sequenz	Aminosäure	bevorzugte Aminosäure
115 (NXXXHXXMYXXYYX)	2	Ser, Cys, Leu, Gly	Cys, Leu
115	3	Thr, Phe, Ile, Ser, Val, Trp, Gly	Phe, Trp
115	4	Val, Ile	Val, Ile
115	6	Val, Ile, Thr	Val, Ile
115	7	Ile, Phe, Val, Leu, Cys	Cys, Val
115	10	Ser, Gly, Tyr, Thr, Ala	Thr, Ser
115	13	Phe, Met, Thr, Leu, Ala, Gly	Leu
116 (HHXXXXWAWW)	3	Ala, Ser, Thr	Ala, Ser besonders bevorzugt Ala
116	4	Thr, Met, Val, Leu, Ile, Ser	Leu, Thr besonders bevorzugt Leu
116	5	Val, Thr, Met, Leu, Ile	Ile, Ser besonders bevorzugt Ile
116	6	Val, Met, Leu, Ile, Ala, Pro, Ser, Phe	Ile, Ser besonders bevorzugt Ile
139 LHXXHH	3	Val, Tyr, Ile	Val, Thr
139	4	Tyr, Phe	Tyr

SEQ ID NO:	Position des X in der Sequenz	Aminosäure	bevorzugte Aminosäure
140 TXXQXXQF	2	Asn, Asp, Thr, Gln, Met, Ser, Ala	Gln
140	3	Thr, Cys, Leu, Met, Ala, Ile, Val, Phe	Ala, Met
140	5	Met, Ile, Leu	Met
140	6	Val, Ile, Leu, Thr, Phe	Leu
141 DTXFMV	3	Leu, Ile, Val, Tyr, Phe, Ala	Phe
142 TQAQXXQF	5	Met, Ile, Leu	Met, Leu besonders bevorzugt Met
142	6	Val, Ile, Leu, Thr, Phe	Leu

Besonders vorteilhafte  $\Delta$ -5-Elongasen enthalten mindestens eine der Sequenzen SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 141 und/oder SEQ ID NO: 142.

5 Besonders vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131 oder SEQ ID NO: 133 dargestellten Sequenz,
- 15 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 132 oder SEQ ID NO: 134 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67,



SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131 oder SEQ ID NO: 133 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131 oder SEQ ID NO: 133 codieren und eine  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität aufweisen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 111 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 112 oder SEQ ID NO: 184 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 111 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 112 oder SEQ ID NO: 184 codieren und eine  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität aufweisen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 aufweisen und eine  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität aufweisen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 89 oder in SEQ ID NO: 97 dargestellten Sequenz,

- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 90 oder SEQ ID NO: 98 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 89 oder SEQ ID NO: 97 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 90 oder SEQ ID NO: 98 codieren und eine  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 99 oder in SEQ ID NO: 101 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 100 oder in SEQ ID NO: 102 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 99 oder in SEQ ID NO: 101 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 100 oder in SEQ ID NO: 102 codieren und eine  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 20 Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 95 oder in SEQ ID NO: 103 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 96 oder SEQ ID NO: 104 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 95 oder SEQ ID NO: 103 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 96 oder SEQ ID NO: 104 codieren und eine  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 30

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 107 oder in SEQ ID NO: 109 dargestellten Sequenz,

- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 107 oder SEQ ID NO: 109 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind Genkonstrukte, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 enthalten, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist. Zusätzlich können weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) im Genkonstrukt enthalten sein. Vorteilhaft sind zusätzlich Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -9-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -9-Elongase oder  $\omega$ -3-Desaturase enthalten.

30 Vorteilhaft stammen alle die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen aus einem eukaryontischen Organismus wie einer Pflanze, einem Mikroorganismus oder einem Tier. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Ordnung Salmoniformes, Xenopus oder Ciona, Algen wie Mantoniella, Crypthecodinium, Euglena oder Ostreococcus, Pilzen wie der Gattung Phytophthora oder von Diatomeen wie den Gattungen Thalassiosira oder Phaeodactylum.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -9-Elongase-Aktivität codieren, werden vorteilhaft allein oder bevorzugt in Kombination in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder einem Mikroorganismus ermöglicht,



eingbracht. Es kann im Nukleinsäurekonstrukt mehr als eine Nukleinsäuresequenz einer enzymatischen Aktivität wie z.B. einer  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase enthalten sein.

- 5 Zum Einbringen werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerasegemisches vor. Die Primer werden in Anlehnung an die zu amplifizierende Sequenz gewählt. Zweckmäßigerweise sollten die Primer so gewählt werden, dass das
- 10 Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann die Analyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung hinsichtlich Qualität und Quantität erfolgen. Im Anschluss kann das Amplifikat nach einem Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifi-
- 15 kats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung. Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilze gewährleisten, und die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die
- 20 T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobakterium-vermittelte Transformation benötigten vir-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promo-
- 25 toren und Terminatoren und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen vir-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer vir-Gene, aber keine T-DNA und ein zweiter T-DNA, jedoch kein vir-Gen trägt. Dadurch sind
- 30 letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in E.-coli als auch in Agrobacterium zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5,
- 35 446–451. Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittenen und erforderlichenfalls gereinigten Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten mit Einsatz von
- 40 Ligase kloniert. Dabei kann ein bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt einen oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen. Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen funktional verknüpft. Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie die oben beschriebenen Promotoren und

Terminatoren. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in Mikroorganismen, insbesondere *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, unter selektiven Bedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen.

- 5 Unter der vorteilhaften Verwendung von Klonierungsvektoren können die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte in Organismen wie Mikroorganismen oder vorteilhaft Pflanzen eingebracht werden und damit bei der Pflanzentransformation verwendet werden, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225)). Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren lassen sich damit zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Organismen vorteilhaft an Pflanzen verwenden, so dass diese bessere und/oder effizientere Produzenten von PUFAs werden.
- 20 Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die eine Veränderung des erfindungsgemäßen  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Proteins sowie der weiteren im Verfahren verwendeten Proteine wie die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Proteine möglich ist, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der vorteilhaft mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer Pflanze bevorzugt in einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund dieses veränderten Proteins direkt beeinflusst werden kann. Die Anzahl oder Aktivität der  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Proteine oder -Gene kann erhöht werden, so dass größere Mengen der Genprodukte und damit letztlich größere Mengen der Verbindungen der allgemeinen Formel I hergestellt werden. Auch eine de novo Synthese in einem Organismus, dem die Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese der Verbindungen vor dem Einbringen des/der entsprechenden Gens/Gene fehlte, ist möglich. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Fettsäure- und Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglicht.

Durch das Einbringen eines  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-

und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Genes in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer

5 Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Fettsäuren, Ölen, polaren und/oder neutralen Lipiden nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert

10 wird. Durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es

15 möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen und vorteilhaft aus Pflanzen zu steigern.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten isolierten Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine oder Teile von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog

20 zu einer Aminosäuresequenz ist, die in den Sequenzen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID

25 NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID

30 NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138 oder SEQ ID NO: 184 dargestellt ist, so dass die Proteine oder Teile davon noch eine  $\Delta$ -12-

35 Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität aufweisen. Vorzugsweise haben die Proteine oder Teile davon, die von dem Nukleinsäuremolekül/den Nukleinsäuremolekülen kodiert wird/werden, noch seine wesentliche enzymatische Aktivität und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen oder Lipidkörperchen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen notwendigen Verbindungen

40 oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Vorteilhaft sind die von den Nukleinsäuremolekülen kodierten Proteine zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr



identisch zu den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138 oder SEQ ID NO: 184 dargestellten Aminosäuresequenzen. Im Sinne der Erfindung ist unter Homologie oder homolog, Identität oder identisch zu verstehen.

Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))], die im GCG Software-Packet [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Diese Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, immer als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -4-Desaturase ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz mit SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID

NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 und deren Derivate codierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch mindestens eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % und ganz besonders 40 % aufweisen und damit am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureester wie Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Stellen gemeint sind.

Vorteilhaft im Verfahren verwendbare Nukleinsäuren stammen aus Bakterien, Pilzen, Diatomeen, Tieren wie *Caenorhabditis* oder *Oncorhynchus* oder Pflanzen wie Algen oder Moosen wie den Gattungen *Shewanella*, *Physcomitrella*, *Thraustochytrium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Ceratodon*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Isochrysis*, *Aleurita*, *Muscarioides*, *Mortierella*, *Borago*, *Phaeodactylum*, *Cryptocodinium*, speziell aus den Gattungen und Arten *Oncorhynchus mykiss*, *Xenopus laevis*, *Ciona intestinalis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus* sp., *Ostreococcus tauri*, *Euglena gracilis*, *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium gramineum*, *Cryptocodinium cohnii*, *Ceratodon purpureus*, *Isochrysis galbana*, *Aleurita farinosa*, *Thraustochytrium* sp., *Muscarioides vialii*, *Mortierella alpina*, *Borago officinalis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Caenorhabditis elegans* oder besonders vorteilhaft aus *Oncorhynchus mykiss*, *Euglena gracilis*, *Thalassiosira pseudonana* oder *Cryptocodinium cohnii*.

Alternativ können im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für eine  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -4-Desaturase codieren und die an eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 dargestellt, vorteilhaft unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Organismen wie Mikroorganismen oder Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

5 Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -4-Desaturase codieren, mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je  
10 nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder  
15 anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette (= Expressionskonstrukt = Genkonstrukt) kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine  
20 zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung  
25 der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte  
30 Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ 5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -9-Elongase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der  
35 Expressionskassette vor. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Gen-  
40 konstrukt vorliegen.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhaft-



erweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- 5 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 oder dessen Derivate definiert sind und für Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138 oder SEQ ID NO: 184 kodieren. Die genannten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Proteine führen dabei vorteilhaft zu einer Desaturierung oder Elongierung von Fettsäuren, wobei das Substrat vorteilhaft ein, zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen aufweist und vorteilhaft 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatome im Fettsäuremolekül aufweist. Gleiches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind.
- 40 Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacIq*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-,  $\lambda$ -PR- oder  $\lambda$ -PL-Promotor und werden vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulations-



sequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF $\alpha$ , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21 (1980) 285–294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP–A–0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397–404 (Gatz et al., Tetracyclin-induzierbar), EP–A–0 335 528 (Abzissinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP–A–0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP Promotor aber auch andere Promotoren wie der LeB4-, DC3, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus Arabidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Bäumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233–239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen lpt–2– oder lpt–1–Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. beschrieben in WO 99/16890.

Um einen besonders hohen Gehalt an PUFAs vor allem in transgenen Pflanzen zu erzielen, sollten die PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft samenspezifisch in Ölsaaten exprimiert werden. Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samen-spezifische Promotoren können prinzipiell sowohl aus dikotyledonen als auch aus monokotyledonen Pflanzen isoliert werden. Im folgenden sind vorteilhafte bevorzugte Promotoren aufgeführt: USP (= unknown seed protein) und Vicilin (Vicia faba) [Bäumlein et al., Mol. Gen Genet., 1991, 225(3)], Napin (Raps) [US 5,608,152], Acyl-Carrier Protein (Raps) [US 5,315,001 und WO 92/18634], Oleosin (Arabidopsis thaliana) [WO 98/45461 und WO 93/20216], Phaseolin (Phaseolus vulgaris) [US 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], Leguminosen B4 (LegB4-Promotor) [Bäumlein et al., Plant J.,

- 2,2, 1992], Lpt2 und lpt1(Gerste) [WO 95/15389 u. WO95/23230], Samen-spezifische Promotoren aus Reis, Mais u. Weizen [WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 und Aleurain [US 5,677,474], Bce4 (Raps) [US 5,530,149], Glycinin (Soja) [EP 571 741], Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase (Soja) [JP 06/62870], ADR12-2 (Soja) [WO 98/08962],
- 5 Isocitratlyase (Raps) [US 5,689,040] oder  $\alpha$ -Amylase (Gerste) [EP 781 849].

- Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt.
- 10 Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

- Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten
- 15 Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase codieren, unter der Kontrolle eines eigenen bevorzugt eines unterschiedlichen Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen führen können. Die
- 20 Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt vorteilhaft in einem Polylinker anschließend gegebenenfalls ein Terminator hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach bevorzugt drei-, vier- oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und
- 25 so zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu dreimal. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über die geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihren eigenen Terminator. Derartige vorteilhafte Konstrukte werden
- 30 beispielsweise in DE 10102337 oder DE 10102338 offenbart. Es ist aber auch möglich mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und ggf. vor einem Terminator zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein,
- 35 ohne dass dadurch die Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielsweise der USP-, LegB4 oder DC3-Promotor und unterschiedliche Terminatoren verwendet werden. Es ist aber auch möglich nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden. Dies kann jedoch zu unerwünschten Rekombinationsereignissen führen.

- 40 Wie oben beschrieben sollte die Transkription der eingebrachten Gene vorteilhaft durch geeignete Terminatoren am 3'-Ende der eingebrachten Biosynthesegene (hinter dem Stoppcodon) abgebrochen werden. Verwendet werden kann hier z.B. der OCS1

Terminator. Wie auch für die Promotoren, so sollten hier für jedes Gen unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) oder deren Kombinationen verwendet. Besonders vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen sind Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -9-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\Delta$ -9-Elongase.

Dabei können die vorgenannten Nukleinsäuren bzw. Gene in Kombination mit anderen Elongasen und Desaturasen in Expressionskassetten, wie den vorgenannten, kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen Mithilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird. Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen in die Pflanze verwendet werden oder aber in einen Vektoren eingebracht werden.

Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen oder  $\Delta$ -4-Desaturasen codieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, die die verwendeten Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie den Acyl-



CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen,  $\omega$ -3-Desaturasasen,  $\Delta$ -4-Desaturasasen,  $\Delta$ -5-Desaturasasen,  $\Delta$ -6-Desaturasasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Desaturasasen,  $\Delta$ -12-Desaturasasen,  $\omega$ 3-Desaturasasen,  $\Delta$ -5-Elongasen,  $\Delta$ -6-Elongasen und/oder  $\Delta$ -9-Elongasen. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere

5 Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind,

10 autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung). Andere Vektoren werden vorteilhaft beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden; da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren, die ähnliche Funktionen

15 ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, TMV, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

20

Die im Verfahren vorteilhaft verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren umfassen die unten beschriebenen Nukleinsäuren oder das oben beschriebene

25 Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der verwendeten Nukleinsäuren in einer Wirtszelle eignen, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem rekombinanten Expressionsvektor

30 bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die

35 Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7,

40 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß,



dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann.

Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Dies ist vorteilhaft, da häufig Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheit halber in Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise können die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Gene in bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1, 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturaseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie bevorzugt in Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*:583-586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jené et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)) exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der  
5 Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten  $\lambda$ -Prophagen  
10 bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe,  
15 pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1,  $\lambda$ gt11 or pBdCl, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen  
20 pYeDesaturasec1 (Baldari et al. (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in:  
25 van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1,  
30 YE<sub>p</sub>6, YE<sub>p</sub>13 oder pEMBLYe23.

Alternativ können die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von  
35 Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum  
40 Beispiel beschrieben in: Cloning Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Weitere geeignete Expres-

sionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- 5 Bei einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens können die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. 10 Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. 15 Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

- Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig 20 verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agrobacterium tumefaciens-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthase bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen 25 in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

- Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die 30 das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

- Die Pflanzengenexpression muss wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Nutzbare Promotoren sind konstitutive 35 Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

- Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in 40 Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine



- Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.
- Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.
- Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-Amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).
- Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölsynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba (Bäumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Bäumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).
- Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können



mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

5 Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der *clpP*-Promotor aus *Arabidopsis*, beschrieben in WO 99/46394.

10 Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, 15 natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen 20 Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise 25 verwendeten Wirtsorganismen sind Mikroorganismen, wie Pilze oder Hefen oder Pflanzenzellen vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfuchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Hanf, Diestel, Erdnuss, Canola, Lein, Soja, Saflor, 30 Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind 35 Ölfuchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Nachtkerze, Sonnenblume, Saflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand sind wie oben beschrieben isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität codieren, wobei die durch die Nukleinsäuresequenzen codierten Elongase C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>- Fettsäuren mit 40 einer Doppelbindung und vorteilhaft mehrfach ungesättigte C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit einer

$\Delta 6$ -Doppelbindung und mehrfach ungesättigte  $C_{20}$ -Fettsäuren mit einer  $\Delta 5$ -Doppelbindung umsetzt.  $C_{22}$ -Fettsäuren werden nicht elongiert.

Vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codieren und die eine Aminosäuresequenz  
 5 enthalten ausgewählt aus der Gruppe einer Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141 oder SEQ ID NO: 142 dargestellten Sequenz.

Weitere vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codieren und die eine Kombination der  
 10 Aminosäuresequenzen enthalten ausgewählt aus der Gruppe:

- a) SEQ ID NO: 115 und SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 115 und SEQ ID NO: 140 oder SEQ ID NO: 139 und SEQ ID NO: 140; oder
- b) SEQ ID NO: 116 und SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 116 und SEQ ID NO: 142 oder SEQ ID NO: 141 und SEQ ID NO: 142; oder
- 15 c) SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 139 und SEQ ID NO: 140 oder SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 141 und SEQ ID NO: 142.

Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codieren enthalten vorteilhaft die vorgenannten Aminosäuresequenzen. Diese werden in Tabelle 2 näher beschrieben.

20 Besonders vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131 oder SEQ ID NO: 133  
 25 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 132 oder SEQ ID NO: 134 dargestellten  
 30 Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131 oder SEQ ID NO: 133 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäu-  
 35

- reebene mit SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 132 oder SEQ ID NO: 134 aufweisen und eine  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität aufweisen.

Weitere Erfindungsgegenstände sind die im folgenden aufgezählten Nukleinsäuresequenzen, die für  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen oder  $\Delta$ -12-Desaturasen codieren.

Weitere vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 111 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 112 oder SEQ ID NO: 184 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 111 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 112 oder SEQ ID NO: 184 codieren und eine  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität aufweisen.

Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 aufweisen und eine  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität aufweisen.

Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 89 oder in SEQ ID NO: 97 dargestellten Sequenz,

- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 90 oder SEQ ID NO: 98 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 89 oder SEQ ID NO: 97 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 90 oder SEQ ID NO: 98 codieren und eine  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.

Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 99 oder in SEQ ID NO: 101 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 100 oder in SEQ ID NO: 102 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 99 oder in SEQ ID NO: 101 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 100 oder in SEQ ID NO: 102 codieren und eine  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 20 Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 95 oder in SEQ ID NO: 103 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 96 oder SEQ ID NO: 104 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 95 oder SEQ ID NO: 103 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 96 oder SEQ ID NO: 104 codieren und eine  $\Delta$ -6-
- 30 Desaturaseaktivität aufweisen.

Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 107 oder in SEQ ID NO: 109 dargestellten Sequenz,



- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 107 oder SEQ ID NO: 109 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.

Die oben genannte erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stammen von Organismen, wie nicht-humanen Tieren, Ciliaten, Pilzen, Pflanzen wie Algen oder Dinoflagellaten,  
10 die PUFAs synthetisieren können.

Vorteilhaft stammen die isolierten oben genannten Nukleinsäuresequenzen aus der Ordnung Salmoniformes, Xenopus oder Ciona, den Diatomeengattungen Thalassiosira oder Crythecodinium oder aus der Familie der Prasinophyceae wie der Gattung Ostreococcus oder der Familie Euglenaceae wie der Gattung Euglena oder Pythiaceae  
15 wie der Gattung Phytophthora stammt.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand sind wie oben beschrieben isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität codieren, wobei die durch die Nukleinsäuresequenzen codierten  $\omega$ -3-Desaturasen  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - und  $C_{22}$ -Fettsäuren mit zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen und vorteilhaft mehrfach  
20 ungesättigte  $C_{18}$ -Fettsäuren mit zwei oder drei Doppelbindungen und mehrfach ungesättigte  $C_{20}$ -Fettsäuren mit zwei, drei oder vier Doppelbindungen umsetzt. Auch  $C_{22}$ -Fettsäuren mit vier oder fünf Doppelbindungen werden desaturiert.

Zu den erfindungsgemäßen Gegenständen gehören außerdem, wie oben beschrieben, isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen und  $\Delta$ -6-Desaturasen codieren, wobei die durch diese  
25 Nukleinsäuresequenzen codierten  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen oder  $\Delta$ -6-Desaturasen  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - und  $C_{22}$ -Fettsäuren mit ein, zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen und vorteilhaft mehrfach ungesättigte  $C_{18}$ -Fettsäuren mit ein, zwei oder drei Doppelbindungen wie  $C18:1^{\Delta 9}$ ,  $C18:2^{\Delta 9,12}$  oder  $C18:3^{\Delta 9,12,15}$ ,  
30 mehrfach ungesättigte  $C_{20}$ -Fettsäuren mit drei oder vier Doppelbindungen wie  $C20:3^{\Delta 8,11,14}$  oder  $C20:4^{\Delta 8,11,14,17}$  oder mehrfach ungesättigte  $C_{22}$ -Fettsäuren mit vier oder fünf Doppelbindungen wie  $C22:4^{\Delta 7,10,13,16}$  oder  $C22:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$  umsetzen. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in den Phospholipiden oder CoA-Fettsäureestern desaturiert, vorteilhaft in den CoA-Fettsäureester.

35 Der Begriff "Nukleinsäure(molekül)", wie hier verwendet, umfasst in einer vorteilhaften Ausführungsform zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der  
40 Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Ein "isoliertes"

Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturasemolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt flankieren.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann Mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Diese können als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) zur Isolierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID

NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei

5 Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch

10 das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St.Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion

15 lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 gezeigten Sequenzen oder Mithilfe der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138 oder SEQ ID NO: 184 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert

45 werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die



einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Homologe der verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 50 oder 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 oder 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 oder 80 %, 90 % oder 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Identität bzw. Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Weiterhin sind isolierte Nukleinsäuremoleküle einer Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID



NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Unter einem Teil gemäß der Erfindung ist dabei zu verstehen, dass mindestens 25 Basenpaare (= bp), 50 bp, 75 bp, 100 bp, 125 bp oder 150 bp, bevorzugt mindestens 175 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp oder 300 bp, besonders bevorzugt 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp oder mehr Basenpaare für die Hybridisierung verwendet werden. Es kann auch vorteilhaft die Gesamtsequenz verwendet werden. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -4-Desaturase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ

ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 kodierten Protein. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), die im GCG Software-Packet [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Die falls nicht anders angegeben als Standardeinstellungen immer für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Homologen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

Homologen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO:

- 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.
- 10 Die vorgenannten Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind, werden im erfindungsgemäßen
- 15 Verfahren zur Modulation der Produktion von PUFAs in transgenen Organismen vorteilhaft in Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-
- 20 Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwendet und/oder
- 25 können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der PUFAs oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Fettsäuren beeinflussen kann).
- 30

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Lipide hat. Da mehrfach ungesättigte Fettsäuren (= PUFAs)

35 nicht nur einfach in Triacylglycerin sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

Besonders zur Herstellung von PUFAs, beispielsweise Stearidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure eignen sich Brasicaceae, Boraginaceen, Primulaceen, oder Linaceen. Besonders vorteilhaft eignet sich Lein (*Linum usitatissimum*) zur Herstellung von PUFAs mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen

40 vorteilhaft, wie beschrieben, in Kombination mit weiteren Desaturasen und Elongasen.



- Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend wieder für die weitere Elongationen aus den Phospholipiden in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-Estern auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.
- Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C<sub>18</sub>-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C<sub>20</sub> und C<sub>22</sub> verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe der im Verfahren verwendeten Desaturasen wie der Δ-12-, ω3-, Δ-4-, Δ-5-, Δ-6- und Δ-8-Desaturasen und/oder der Δ-5-, Δ-6-, Δ-9-Elongasen können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure vorteilhaft Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure hergestellt werden und anschließend für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden. Mit den genannten Enzymen können C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit vorteilhaft vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül hergestellt werden. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, einschließlich einer weiteren Elongation von C<sub>20</sub> zu C<sub>22</sub>-Fettsäuren, zu Fettsäuren wie γ-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Arachidonsäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Substrate der verwendeten Desaturasen und Elongasen im erfindungsgemäßen Verfahren sind C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>- oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren wie zum Beispiel Linolsäure, γ-Linolensäure, α-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Eicosatetraensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Sub-



strate sind Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure und/oder  $\alpha$ -Linolensäure, Dihomo- $\gamma$ -linolensäure bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die synthetisierten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen in der Fettsäure fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester beispielsweise in Form ihrer Glyceride an.

Unter dem Begriff "Glycerid" wird ein mit ein, zwei oder drei Carbonsäureresten verestertes Glycerin verstanden (Mono-, Di- oder Triglycerid). Unter "Glycerid" wird auch ein Gemisch an verschiedenen Glyceriden verstanden. Das Glycerid oder das Glyceridgemisch kann weitere Zusätze, z.B. freie Fettsäuren, Antioxidantien, Proteine, Kohlenhydrate, Vitamine und/oder andere Substanzen enthalten.

Unter einem "Glycerid" im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ferner vom Glycerin abgeleitete Derivate verstanden. Dazu zählen neben den oben beschriebenen Fettsäureglyceriden auch Glycerophospholipide und Glyceroglycolipide. Bevorzugt seien hier die Glycerophospholipide wie Lecithin (Phosphatidylcholin), Cardiolipin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin und Alkylacylglycerophospholipide beispielhaft genannt.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).

Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

Die im Verfahren hergestellten PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höhere Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden, beispielsweise können Katzen Arachidonsäure nicht mehr synthetisieren.

Unter Phospholipiden im Sinne der Erfindung sind zu verstehen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin und/oder Phosphatidylinositol vorteilhafterweise Phosphatidylcholin. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (Verbindungen der Formel I), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Es umfasst auch die Produktivität innerhalb einer Pflanzenzelle oder einer Pflanze, das heißt den Gehalt an den gewünschten im Verfahren hergestellten Fettsäuren bezogen auf den Gehalt an allen Fettsäuren in dieser Zelle oder Pflanze. Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls wieder gegeben in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 Proteine mit mindestens 40 %, vorteilhaft etwa 50 oder 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 oder 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 oder 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie (= Identität) zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID

NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134 oder SEQ ID NO: 184. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), die im GCG Software-Packet [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm BestFit über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Die falls nicht anders angegeben als Standardeinstellungen immer für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase oder  $\Delta$ -5-Elongase codieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird.

Zusätzlich zu den in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 gezeigten  $\Delta$ -12-



Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen oder  $\Delta$ -6-Elongasen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase führen, innerhalb einer Population existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in der  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Nukleinsäuremoleküle können auf der Grundlage ihrer Homologie zu den hier offenbarten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Nukleinsäuren unter Verwendung der Sequenzen oder eines Teils davon als Hybridisierungs-sonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Dabei können beispielsweise isolierte Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die mindestens 15 Nukleotide lang sind und unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekülen, die eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 umfassen, hybridisieren. Es können auch Nukleinsäuren mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide verwendet werden. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis



65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im obengenannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134 oder SEQ ID NO: 184) oder von zwei Nukleinsäuren (z.B. SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183) werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder

Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen. Die verwendeten Programme bzw. Algorithmen sind oben beschrieben.

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für eine  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134 oder SEQ ID NO: 184 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryp-

tophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -6-Elongase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -6-Elongase kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität beibehalten haben. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests bestimmt werden.

Weitere Erfindungsgegenstände sind transgene nicht-humane Organismen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133 oder SEQ ID NO: 183 enthalten oder ein Genkonstrukt oder einen Vektor, die diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Vorteilhaft handelt es sich bei dem nicht-humanen Organismus um einen Mikroorganismus, ein nicht-humanes Tier oder eine Pflanze, besonders bevorzugt um eine Pflanze.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

## Beispiele

## Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren:

- Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

## Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

- Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

## 15 Beispiel 3: Klonierung von Genen aus Oncorhynchus mykiss

Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen entsprechend der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene wurden zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in der Sequenzdatenbank von Genbank identifiziert.

Gen-Name	Genbank No	Aminosäuren
OmELO2	CA385234, CA364848, CA366480	264
OmELO3	CA360014, CA350786	295

- Gesamt-RNA von Oncorhynchus mykiss wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Valencia, CA, US) isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von oligo-dT-Cellulose poly-A+ RNA (mRNA) isoliert (Sambrook et al., 1989). Die RNA wurde mit dem Reverse Transcription System Kit von Promega revers transkribiert und die synthetisierte cDNA in den lambda ZAP Vektor (lambda ZAP Gold, Stratagene) kloniert. Entsprechend Herstellerangaben wurde die cDNA zur Plasmid-DNA entpackt.
- Die cDNA-Plasmid-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden verwendet.



#### Beispiel 4: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen

Für die Klonierung der zwei Sequenzen zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Primer	Nukleotidsequenz
5' f* OmELO2	5' aagcttacataatggcttcaacatggcaa (SEQ ID NO: 179)
3' r* OmELO2	5' ggatccttatgtcttcttgctcttcctgtt (SEQ ID NO: 180)
5' f OmELO3	5' aagcttacataatggagacttttaaat (SEQ ID NO: 181)
3' r OmELO3	5' ggatccttcagtcctccctcactttcc (SEQ ID NO: 182)

\* f: forward, r: reverse

#### 5 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µL 2mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

#### 10 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

#### Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

#### 15 Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR Produkt wurde für 2 h bei 37 °C mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI inkubiert. Der Hefe-Expressionsvektor pYES3 (Invitrogen) wurde in gleicherweise inkubiert. Anschliessend wurde das 812 bp bzw. 905 bp große PCR Produkt sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolge mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und Elongase cDNA ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pYES3-OmELO2 und pYES3-OmELO3 wurden durch

25 Sequenzierung verifiziert und in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde pYES3 parallel transformiert. Anschliessend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Tryptophan mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die auf ohne Tryptophan im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES3, pYES3-OmELO2

30 (SEQ ID NO: 51) und pYES3-OmELO3 (SEQ ID NO: 53). Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Beispiel 5: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurde mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende des kodierenden Sequenz eingefügt:

PSUN-OmELO2

Forward: 5'-GCGGCCGCATAATGGCTTCAACATGGCAA (SEQ ID NO: 175)

Reverse: 3'-GCGGCCGCTTATGTCTTCTTGCTCTTCCTGTT (SEQ ID NO: 176)

PSUN-OMELO3

Forward: 5'-GCGGCCGCataatggagacttttaaat (SEQ ID NO: 177)

Reverse: 3'-GCGGCCGCtcagtcacccctcactttcc (SEQ ID NO: 178)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µL 2mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert. Anschliessend wurde die PCR-Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolge mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-OmELO2 und pSUN-OmELO3 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthese-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and

transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982) Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das

5 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standard-primer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC GGATCTGCTGGCTATGAA-3', SEQ ID NO: 174). Das PCR-Fragment wurde mit

10 EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

#### Beispiel 6: Lipidextraktion aus Hefen und Samen:

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder

15 auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese

20 Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al.,

25 (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological

30 Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie

35 von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr,

40 Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

Dann wird 10 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 M methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack,



WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fettsäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung kann durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS weiter analysiert werden.

Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES3, pYES3-OmELO2 und pYES3-OmELO3 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 10 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma).

Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel 7: Funktionelle Charakterisierung von OmELO2 und OmELO3:

OmELO2 zeigt keine Elongase-Aktivität, während für OmELO3 eine deutliche Aktivität mit verschiedenen Substraten nachgewiesen werden konnte. Die Substratspezifität der OmELO3 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Figur 2). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Alle transgene Hefen zeigen die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OmELO3-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen OmELO3 funktional exprimiert werden konnte.

Figur 2 zeigt, dass die OmELO3 eine Substratspezifität aufweist, die mit hoher Spezifität zur Verlängerung von Δ5- und Δ6-Fettsäuren mit einer ω3-Doppelbindung führt. Es konnte in geringerer Spezifität des weiteren auch ω6-Fettsäuren (C18 und C20)

elongiert werden. Stearidonsäure (C18:4  $\omega$ 3) und Eicosapentaensäure (C20:5  $\omega$ 3) stellen die besten Substrate für die OmElo3 dar (bis zu 66 % Elongation).

#### Beispiel 8: Rekonstitution der Synthese von DHA in Hefe

Die Rekonstitution der Biosynthese von DHA (22:6  $\omega$ 3) wurde ausgehend von EPA (20:5  $\omega$ 3) bzw. Stearidonsäure (18:4  $\omega$ 3) durch die Coexpression der OmElo3 mit der  $\Delta$ -4-Desaturase aus *Euglena gracilis* bzw. der  $\Delta$ -5-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* und der  $\Delta$ -4-Desaturase aus *Euglena gracilis* durchgeführt. Dazu wurden weiterhin die Expressionsvektoren pYes2-EgD4 und pESCLeu-PtD5 konstruiert. Der o.g. Hefestamm, der bereits mit dem pYes3-OmElo3 (SEQ ID NO: 55) transformiert ist, wurde weiter mit dem pYes2-EgD4 bzw. gleichzeitig mit pYes2-EgD4 und pESCLeu-PtD5 transformiert. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplett-Minimalmedium-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Tryptophan und Uracil im Falle des pYes3-OmELO/pYes2-EgD4-Stammes und ohne Tryptophan, Uracil und Leucin im Falle des pYes3-OmELO/pYes2-EgD4+pESCLeu-PtD5-Stammes. Die Expression wurde wie oben angegeben durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 120 h bei 15°C inkubiert.

Figur 3 zeigt die Fettsäureprofile von transgenen Hefen, die mit 20:5  $\omega$ 3 gefüttert wurden. In der Kontroll-Hefe (A), die mit dem pYes3-OmElo3-Vektor und dem leeren Vektor pYes2 transformiert wurden, wurde 20:5  $\omega$ 3 sehr effizient zu 22:5  $\omega$ 3 elongiert (65% Elongation). Die zusätzliche Einführung der Eg $\Delta$ -4-Desaturase führte zu der Umsetzung von 22:5  $\omega$ 3 zu 22:6  $\omega$ 3 (DHA). Die Fettsäure-Zusammensetzung der transgenen Hefen ist in Figure 5 wiedergegeben. Nach der Co-Expression von OmElo3 und EgD4 konnte bis zu 3% DHA in Hefen nachgewiesen werden.

In einem weiteren Co-Expressionsexperiment wurden OmElo3, EgD4 und eine  $\Delta$ 5-Desaturase aus *P. tricornutum* (PtD5) zusammen exprimiert. Die transgenen Hefen wurden mit Stearidonsäure (18:4  $\omega$ 3) gefüttert und analysiert (Figur 4). Die Fettsäure-Zusammensetzung dieser Hefen ist in Figur 5 aufgeführt. Durch OmElo3 wurde die gefütterte Fettsäure 18:4  $\omega$ 3 zu 20:4  $\omega$ 3 elongiert (60% Elongation). Letztere wurde durch die PtD5 zu 20:5  $\omega$ 3 desaturiert. Die Aktivität der PtD5 betrug 15%. 20:5  $\omega$ 3 konnte weiterhin durch die OmElo3 zu 22:5  $\omega$ 3 elongiert werden. Im Anschluß wurde die neu synthetisierte 22:5  $\omega$ 3 zu 22:6  $\omega$ 3 (DHA) desaturiert. In diesen Experimenten konnte bis zu 0,7% DHA erzielt werden.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die in dieser Erfindung verwendeten Sequenzen OmElo3, EgD4 und PtD5 für die Produktion von DHA in eukaryotischen Zellen geeignet sind.

## Beispiel 9: Erzeugung von transgenen Pflanzen

## a) Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

5 Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen können binäre Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 oder *Escherichia coli* genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nordeutsche Pflanzenzucht, Höhenlieth, Deutschland), wird eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit  
10 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) werden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Colnkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wird nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit weiterge-  
15 führt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 µM Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse werden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bilden sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum  
20 Bewurzeln zum Medium gegeben.

Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf Elongase-Expression wie  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität  
25 oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an C20- und C22 mehrfachungesättigten Fettsäuren können so identifiziert werden.

## b) Herstellung von transgenen Leinpflanzen

30 Die Herstellung von transgenen Leinpflanzen können zum Beispiel nach der Methode von Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 35(6):456-465 mittels particle bombardment erzeugt werden. In der Regel wurde eine Agrobakterien-vermittelte Transformation zum Beispiel nach Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282-285 zur Leintransformation verwendet.

35 Beispiel 10: Klonierung von  $\Delta$ 5-Elongase-Genen aus *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 und *Thraustochytrium* ssp.

Durch Vergleiche der verschiedenen in dieser Anmeldung gefundenen Elongase-Proteinsequenzen konnten konservierte Nukleinsäurebereiche definiert werden (Histidin-Box: His-Val-X-His-His, Tyrosin-Box: Met-Tyr-X-Tyr-Tyr). Mit Hilfe dieser Sequenzen wurde eine EST-Datenbank von *T. aureum* ATCC34304 und *Thrausto-*

chytrium ssp. nach weiteren  $\Delta$ -5-Elongasen durchsucht. Folgende neue Sequenzen konnten gefunden werden:

Gen-Name	Nukleotide	Aminosäuren
BioTaurELO1	828 bp	275
TL16y2	831	276

5 Gesamt-RNA von *T. aureum* ATCC34304 und *Thraustochytrium* ssp. wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Valencia, CA, US) isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des PolyAtract Isolierungssystems (Promega) mRNA isoliert. Die mRNA wurde mit dem Marathon cDNA Amplification-Kit (BD Biosciences) reverse transkribiert und entsprechend der Herstellerangaben Adaptoren ligiert. Die cDNA-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden mittels 5'- und 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) verwendet.

10 Beispiel 11: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen

Für die Klonierung der Sequenz zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Primer	Nukleotidsequenz
5' f* BioTaurELO1	5' gacataatgacgagcaacatgag (SEQ ID NO: 170)
3' r* BioTaurELO1	5' cggcttaggccgactggccttggg (SEQ ID NO: 171)
5'f*TL16y2	5' agacataatggacgtcgtcgagcagcaatg (SEQ ID NO: 172)
3'r*TL16y2	5' ttagatggtcttctgcttcttgggcgcc (SEQ ID NO: 173)

\* f: forward, r: reverse

15

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50  $\mu$ L):

5,00  $\mu$ L Template cDNA

5,00  $\mu$ L 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00  $\mu$ L 2mM dNTP

20

1,25  $\mu$ L je Primer (10 pmol/ $\mu$ L)

0,50  $\mu$ L pfu-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurde eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

25

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35



- Die PCR Produkte BioTaurELO1 (siehe SEQ ID NO: 65) und TL16y2 (siehe SEQ ID NO: 83) wurde für 30 min bei 21 °C mit dem Hefe-Expressionsvektor pYES2.1-TOPO (Invitrogen) inkubiert gemäss Herstellerangaben. Das PCR-Produkt wird dabei durch einen T-Überhang und Aktivität einer Topoisomerase (Invitrogen) in den Vektor ligiert.
- 5 Nach der Inkubation erfolgte dann die Transformation von E. coli DH5 $\alpha$  Zellen. Entsprechende Klone wurden durch PCR identifiziert, die Plasmid-DNA mittels Qiagen DNAeasy-Kit isoliert und durch Sequenzierung verifiziert. Die korrekte Sequenz wurde dann in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pYES2.1 parallel transformiert.
- 10 Anschließend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Uracil mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die ohne Uracil im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES2.1, pYES2.1-BioTaurELO1 und pYES2.1-TL16y2. Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

15

Beispiel 12: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurde mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende des kodierenden Sequenz eingefügt:
- 20

PSUN-BioTaurELO1

Forward: 5'-GCGGCCGCGCATAATGACGAGCAACATGAGC (SEQ ID NO: 166)

- 25 Reverse: 3'-GCGGCCGCTTAGGCCGACTTGGCCTTGGG (SEQ ID NO: 167)

PSUN-TL16y2

Forward: 5'-GCGGCCGCGACCATGGACGTCGTCGAGCAGCAATG (SEQ ID NO: 168)

- 30 Reverse: 5'-GCGGCCGCTTAGATGGTCTTCTGCTTCTTGGGCGCC (SEQ ID NO: 169)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50  $\mu$ L):

- 5,00  $\mu$ L Template cDNA  
5,00  $\mu$ L 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00  $\mu$ L 2mM dNTP  
35 1,25  $\mu$ L je Primer (10 pmol/ $\mu$ L)  
0,50  $\mu$ L Advantage-Polymerase  
Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

5 Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert.  
10 Anschliessend wurde die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolge mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide  
15 pSUN-BioTaurELO1 und pSUN-TL16y2 wurden durch Sequenzierung verifiziert.

pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das  
20 Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982) Der USP-Promotor ent-  
25 spricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standard-primer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine  
30 PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC GGATCTGCTGGCTATGAA-3', SEQ ID NO: 165). Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von Arabidopsis thaliana, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

35

Die Lipidextraktion aus Hefen und Samen erfolgte identisch zu Beispiel 6.

Beispiel 13: Funktionelle Charakterisierung von BioTaurELO1 und TL16y2:

Die Substratspezifität der BioTaurELO1 konnte nach Expression und Fütterung  
40 verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Figur 6). Figur 6 zeigt die Fütterungs-experimente zur Bestimmung der Funktionalität und Substratspezifität mit Hefe-

stämmen, die entweder den Vektor pYes2.1 (Kontrolle = Control) oder den Vektor pYes2.1-BioTaurELO1 (= BioTaur) mit der  $\Delta$ -5-Elongase enthalten. In beiden Ansätzen wurde 200  $\mu$ M  $\gamma$ -Linolensäure und Eicosapentaensäure dem Hefeinkubationsmedium zugesetzt und 24 h inkubiert. Nach Extraktion der Fettsäuren aus den Hefen wurden diese transmethyliert und gaschromatographisch aufgetrennt. Die aus den beiden gefütterten Fettsäuren entstandenen Elongationsprodukte sind durch Pfeile markiert.

Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Alle transgene Hefen zeigen die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der BioTaurELO1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen BioTaurELO1 funktional exprimiert werden konnte.

Figur 6 zeigt, dass die BioTaurELO1 eine Substratspezifität aufweist, die mit hoher Spezifität zur Verlängerung von  $\Delta$ 5- und  $\Delta$ 6-Fettsäuren mit einer  $\omega$ 3-Doppelbindung führt. Des weiteren konnten auch  $\omega$ 6-Fettsäuren (C18 und C20) elongiert werden. Es werden  $\gamma$ -Linolensäure (C18:3  $\omega$ 6) mit 65,28 %, Stearidonsäure (C18:4  $\omega$ 3) mit 65,66 % und Eicosapentaensäure (C20:5  $\omega$ 3) mit 22,01 % Konversion umgesetzt. Die Substratspezifitäten der verschiedenen Fütterungsexperimente sind in Tabelle 3 dargestellt (siehe am Ende der Beschreibung).

Die Konversionsrate von GLA bei Fütterung von GLA und EPA betrug 65,28 %. Die Konversionsrate von EPA bei gleicher Fütterung von GLA und EPA betrug 9,99 %. Wurde nur EPA gefüttert, so betrug die Konversionsrate von EPA 22,01 %. Auch Arachidonsäure (= ARA) wurde bei Fütterung umgesetzt. Die Konversionsrate betrug 14,47 %. Auch Stearidonsäure (= SDA) wurde umgesetzt. In diesem Fall betrug die Konversionsrate 65,66 %.

Die Funktionalität und Substratspezifität von TL16y2 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden. Tabelle 4 zeigt die Fütterungsexperimente. Die Fütterungsversuche wurden in gleicherweise durchgeführt wie für BioTaurELO1 beschrieben. Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der TL16y2-Reaktion (Fig. 11). Dies bedeutet, dass das Gen TL16y2 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 4: Expression von TL16y2 in Hefe.

Flächen der gaschromatographischen Analyse in %									
Plasmid	Fettsäure	C18:3 (n-6)	C18:4 (n-3)	C20:3 (n-6)	C20:4 (n-6)	C20:4 (n-3)	C20:5 (n-3)	C22:4 (n-6)	C22:5 (n-3)
pYES	250 uM EPA						13,79		
TL16y2	250 uM EPA						25,81		2,25
pYES	50 uM EPA						5,07		
TL16y2	50 uM EPA						2,48		1,73
pYES	250 uM GLA	8,31							
TL16y2	250 uM GLA	3,59		10,71					
pYES	250 uM ARA				16,03				
TL16y2	250 uM ARA				15,2		3,87		
pYES	250 uM SDA		26,79			0,35			
TL16y2	250 uM SDA		7,74			29,17			

Die in Tabelle 4 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen mit TL16y2 gegenüber der Kontrolle folgende prozentuale Umsätze: a) % Umsatz EPA (250 uM): 8 %, b) % Umsatz EPA (50 uM): 41 %, c) % Umsatz ARA: 20,3 %, d) % Umsatz SDA: 79, 4% und e) % Umsatz GLA: 74,9 %.

TL16y2 zeigt damit  $\Delta 5$ -,  $\Delta 6$ - und  $\Delta 8$ -Elongaseaktivität. Dabei ist die Aktivität für C18-Fettsäuren mit  $\Delta 6$ -Doppelbindung am höchsten. Abhängig von der Konzentration an gefütterten Fettsäuren werden dann C20-Fettsäuren mit einer  $\Delta 5$ - bzw.  $\Delta 8$ -Doppelbindung verlängert.

Beispiel 14: Klonierung von Genen aus *Ostreococcus tauri*

Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit  $\Delta 5$ -Elongaseaktivität oder  $\Delta 6$ -Elongaseaktivität konnten zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Ostreococcus tauri* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden.



Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
OtELO1, ( $\Delta$ -5-Elongase)	SEQ ID NO: 67	300
OtELO2, ( $\Delta$ -6-Elongase)	SEQ ID NO: 69	292

- 5 OtElo1 weist die höchste Ähnlichkeit zu einer Elongase aus *Danio rerio* auf (GenBank AAN77156; ca. 26 % Identität), während OtElo2 die größte Ähnlichkeit zur *Physcomitrella Elō* (PSE) [ca. 36 % Identität] aufweist (Alignments wurden mit dem tBLASTn-Aalgorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410) durchgeführt.

Die Klonierung wurde wie folgt durchgeführt:

- 10 40 ml einer *Ostreococcus tauri* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Aqua bidest resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der OtElo-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ l aufgetauten Zellen, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt:
- 15 Erste Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 30 Sekunden,  $55^{\circ}\text{C}$  für 1 Minute und  $72^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten.

Beispiel 15: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

- 20 Zur Charakterisierung der Funktion der Elongasen aus *Ostreococcus tauri* wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen DNAs stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei pOTE1 und pOTE2 erhalten wurden.

- 25 Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pOTE1 bzw. pOTE2 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplett-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

- 30 Für die Expresssion der Ot-Elongasen wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei  $30^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm inkubiert. 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300  $\mu$ M verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,05 angeimpft.

Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel 16: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- 5 Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen wurden von den 5'- und 3-Bereich von OtElo1 und OtElo2 abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 10 5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
0,50 µL Advantage-Polymerase
- 15 Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.  
Reaktionsbedingungen der PCR:  
Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- 20 Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert. Anschliessend wurde die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-OtELO1 und pSUN-OtELO2 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- 30 pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Ostreococcus-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfrag-
- 35

ment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz:

5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC

5 GGATCTGCTGGCTATGAA-3', SEQ ID NO: 164).

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

#### 10 Beispiel 17: Expression von OtELO1 und OtELO2 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 15 mit den Plasmiden pYES3, pYES3-OtELO1 und pYES3-OtELO2 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente  
15 mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organi-  
20 schen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für  
25 die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001,  
30 *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

#### Beispiel 18: Funktionelle Charakterisierung von OtELO1 und OtELO2:

Die Substratspezifität der OtElo1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener  
35 Fettsäuren ermittelt werden (Tab.5). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen OtElo1 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 4 zeigt, dass die OtElo1 eine enge Substratspezifität aufweist. Die OtElo1 konnte nur die C20-Fettsäuren Eicosapentaensäure (Figur 7) und Arachidonsäure (Figur 8) elongieren, bevorzugte aber die  $\omega$ -3-desaturierte Eicosapentaensäure.

Tabelle 5:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %)
16:0	-
16:1 <sup><math>\Delta^9</math></sup>	-
18:0	-
18:1 <sup><math>\Delta^9</math></sup>	-
18:1 <sup><math>\Delta^{11}</math></sup>	-
18:2 <sup><math>\Delta^{9,12}</math></sup>	-
18:3 <sup><math>\Delta^{6,9,12}</math></sup>	-
18:3 <sup><math>\Delta^{5,9,12}</math></sup>	-
20:3 <sup><math>\Delta^{8,11,14}</math></sup>	-
20:4 <sup><math>\Delta^{5,8,11,14}</math></sup>	<b>10,8 <math>\pm</math> 0,6</b>
20:5 <sup><math>\Delta^{5,8,11,14,17}</math></sup>	<b>46,8 <math>\pm</math> 3,6</b>
22:4 <sup><math>\Delta^{7,10,13,16}</math></sup>	-
22:6 <sup><math>\Delta^{4,7,10,13,16,19}</math></sup>	-

5

Tabelle 5 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo1 für C20 polyungesättigte Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta^5$  Position gegenüber verschiedenen Fettsäuren.

10 Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert (n=3)  $\pm$  Standardabweichung wieder.



Die Substratspezifität der OtElo2 (SEQ ID NO: 81) konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 6). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo2-Reaktion.

- 5 Dies bedeutet, dass das Gen OtElo2 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 6:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %)
16:0	-
16:1 <sup>Δ9</sup>	-
16:3 <sup>Δ7,10,13</sup>	-
18:0	-
18:1 <sup>Δ6</sup>	-
18:1 <sup>Δ9</sup>	-
18:1 <sup>Δ11</sup>	-
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	-
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	15,3±
18:3 <sup>Δ5,9,12</sup>	-
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	21,1±
20:2 <sup>Δ11,14</sup>	-
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	-
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	-
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	-
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	-
22:5 <sup>Δ7,10,13,16,19</sup>	-
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	-

Tabelle 6 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo2 gegenüber verschiedenen Fettsäuren.

- 10 Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE2 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert (n=3) ± Standardabweichung wieder.

Die enzymatische Aktivität, die in Tabelle 6 wiedergegeben wird, zeigt klar, dass OTELO2 eine  $\Delta$ -6-Elongase ist.

Beispiel 19: Klonierung von Genen aus *Thalassiosira pseudonana*

- 5 Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität konnten zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Thalassiosira pseudonana* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
TpELO1 ( $\Delta$ 5-Elongase)	43	358
TpELO2 ( $\Delta$ 5-Elongase)	59	358
TpELO3 ( $\Delta$ 6-Elongase)	45	272

- 10 Eine 2 L Kultur von *T. pseudonana* wurde in f/2 Medium (Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (Eds. Smith, W.L. and Chanley, M.H.), Plenum Press, New York, pp 29–60.) für 14 d (= Tage) bei einer Lichtstärke von 80 E/cm<sup>2</sup> angezogen. Nach Zentrifugation der Zellen wurde RNA mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Quiagen (Valencia, CA, US) nach Herstellerangaben isoliert. Die mRNA wurde mit dem Marathon cDNA
- 15 Amplifikation-Kit (BD Biosciences) reverse transkribiert und entsprechend den Herstellerangaben Adaptoren ligiert. Die cDNA-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden mittels 5'- und 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) verwendet.

- 20 Beispiel 20: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in - Hefen

- Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der TpElo-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ L cDNA, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U *Advantage*-Polymerase und 100 pmol eines jeden
- 25 Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Für die Klonierung der Sequenz zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Gen-Name und SEQ ID NO:	Primersequenz
TpELO1 ( $\Delta$ 5-Elongase), SEQ ID NO: 59	F:5'-accatgtgctcaccaccgcccgtc (SEQ ID NO: 158) R:5'-ctacatggcaccagtaac (SEQ ID NO: 159)
TpELO2 ( $\Delta$ 5-Elongase), SEQ ID NO: 85	F:5'-accatgtgctcatcaccgcccgtc (SEQ ID NO: 160) R:5'-ctacatggcaccagtaac (SEQ ID NO: 161)
TpELO3 ( $\Delta$ 6-Elongase), SEQ ID NO: 45	F:5'-accatggacgcctacaacgctgc (SEQ ID NO: 162) R:5'-ctaagcactcttcttctt (SEQ ID NO: 163)

\*F=forward primer, R=reverse primer

- Die PCR Produkte wurde für 30 min bei 21 °C mit dem Hefe-Expressionsvektor - pYES2.1-TOPO (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben inkubiert. Das PCR-Produkt wird dabei durch einen T-Überhang und Aktivität einer Topoisomerase (Invitrogen) in den Vektor ligiert. Nach der Inkubation erfolgte dann die Transformation von E. coli DH5 $\alpha$  Zellen. Entsprechende Klone wurden durch PCR identifiziert, die Plasmid-DNA mittels Qiagen DNAeasy-Kit isoliert und durch Sequenzierung verifiziert. Die korrekte Sequenz wurde dann in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pYES2.1 parallel transformiert. Anschließend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Uracil mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die ohne Uracil im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES2.1, pYES2.1-TpELO1, pYES2.1-TpELO2 und pYES2.1-TpELO3. Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Beispiel 21: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wird mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:

PSUN-TPELO1

Forward: 5'-GCGGCCGACCATGTGCTCACCACCGCCGTC (SEQ ID NO: 152)

Reverse: 3'-GCGGCCGCCTACATGGCACCAGTAAC (SEQ ID NO: 153)

## PSUN-TPELO2

Forward: 5'-GCGGCCGCGACCATGTGCTCATCACCGCCGTC (SEQ ID NO: 154)

Reverse: 3'-GCGGCCGCGCTACATGGCACCAGTAAC (SEQ ID NO: 155)

## PSUN-TPELO3

5 Forward: 5'-GCGGCCGCGacccatggacgcctacaacgctgc (SEQ ID NO: 156)

Reverse: 3'-GCGGCCGCGCTAAGCACTCTTCTTCTTT (SEQ ID NO: 157)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

10 5,00 µL 2mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

15 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert.

20 Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert.

Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschließend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert.

25 Dazu wird das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-TPELO1, pSUN-TPELO2 und pSUN-TPELO3 werden durch Sequenzierung verifiziert.

pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant

30 transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadeny-

lierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map

35 of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982) Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment



wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert.

(Primersequenz: 5'-

GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC

5 GGATCTGCTGGCTATGAA-3'; SEQ ID NO: 151).

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

10 Die Lipidextraktion aus Hefen und Samen erfolgte identisch zu Beispiel 6.

Beispiel 22: Expression von TpELO1, TpELO2 und TpELO3 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2, pYES2-TpELO1, pYES2-TpELO2 und pYES2-TpELO3 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

15 Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei  
20 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-  
25 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

30 Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

35 Beispiel 23: Funktionelle Charakterisierung von TpELO1 und TpELO3:

Die Substratspezifität der TpElo1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 9). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen

in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der TpElo1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen TpElo1 funktional exprimiert werden konnte.

- 5 Tabelle 7 zeigt, dass die TpElo1 eine enge Substratspezifität aufweist. Die TpElo1 konnte nur die C20-Fettsäuren Eicosapentaensäure und Arachidonsäure elongieren, bevorzugte aber die  $\omega$ -3-desaturierte Eicosapentaensäure.

- 10 Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-TpELO1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Tabelle 7: Expression von TpELO1 in Hefe. In den Spalten 1 und 3 sind die Kontrollreaktionen für die Spalten 2 (gefüttert 250  $\mu$ M 20:4  $\Delta$ 5,8,11,14) und 4 (gefüttert 250  $\mu$ M 20:5  $\Delta$ 5,8,11,14,17) wiedergegeben.

	Expression	Expression	Expression	Expression
Fettsäuren	1	2	3	4
16:0	18.8	17.8	25.4	25.2
16:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	28.0	29.8	36.6	36.6
18:0	5.2	5.0	6.8	6.9
18:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	25.5	23.6	24.6	23.9
20:4 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14</sup>	<b>22.5</b>	<b>23.4</b>	-	-
22:4 <sup><math>\Delta</math>7,10,13,16</sup>	-	<b>0.4</b>	-	-
20:5 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14,17</sup>	-	-	<b>6.6</b>	<b>6.5</b>
22:5 <sup><math>\Delta</math>7,10,13,16,19</sup>	-	-	-	<b>0.9</b>
% Umsatz	<b>0</b>	<b>1.7</b>	<b>0</b>	<b>12.2</b>

- 15 Die Substratspezifität der TpElo3 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 10). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der TpElo3-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen TpElo3 funktional exprimiert werden konnte.
- 20 Tabelle 8 zeigt, dass die TpElo3 eine enge Substratspezifität aufweist. Die TpElo3 konnte nur die C18-Fettsäuren  $\gamma$ -Linolensäure und Stearidonsäure elongieren, bevorzugte aber die  $\omega$ -3-desaturierte Stearidonsäure.

Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-TpELO3 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

- 5 Tabelle 8: Expression von TpELO3 in Hefe. Spalte 1 zeigt das Fettsäureprofil von Hefe ohne Fütterung. Spalte 2 zeigt die Kontrollreaktion. In den Spalten 3 bis 6 wurden  $\gamma$ -Linolensäure, Stearidonsäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure gefüttert (250  $\mu$ M jeder Fettsäure).

Fettsäuren	1	2	3	4	5	6
16:0	17.9	20.6	17.8	16.7	18.8	18.8
16:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	41.7	18.7	27.0	33.2	24.0	31.3
18:0	7.0	7.7	6.4	6.6	5.2	6.0
18:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	33.3	16.8	24.2	31.8	25.5	26.4
18:2 <sup><math>\Delta</math>9,12</sup>	-	<b>36.1</b>	-	-	-	-
18:3 <sup><math>\Delta</math>6,9,12</sup>	-	-	<b>6.1</b>	-	-	-
18:4 <sup><math>\Delta</math>6,9,12,15</sup>	-	-	-	<b>1.7</b>	-	-
20:2 <sup><math>\Delta</math>11,14</sup>	-	<b>0</b>	-	-	-	-
20:3 <sup><math>\Delta</math>8,11,14</sup>	-	-	<b>18.5</b>	-	-	-
20:4 <sup><math>\Delta</math>8,11,14,17</sup>	-	-	-	<b>10.0</b>	-	-
20:4 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14</sup>	-	-	-	-	<b>22.5</b>	-
22:4 <sup><math>\Delta</math>7,10,13,16</sup>	-	-	-	-	<b>0</b>	-
20:5 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14,17</sup>	-	-	-	-	-	<b>17.4</b>
22:5 <sup><math>\Delta</math>7,10,13,16,19</sup>	-	-	-	-	-	<b>0</b>
% Umsatz	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>75</b>	<b>85</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

- 10 Beispiel 24: Klonierung eines Expressionsplasmides zur heterologen Expression der Pi-omega3Des in Hefen

- Der Pi-omega3Des Klon wurde für die heterologe Expression in Hefen über PCR mit entsprechenden Pi-omega3Des spezifischen Primern in den Hefe-Expressionsvektor pYES3 kloniert. Dabei wurde ausschließlich der für das Pi-omega3Des Protein
- 15 kodierende offene Leseraster des Gens amplifiziert und mit zwei Schnittstellen für die Klonierung in den pYES3 Expressionsvektor versehen:

Forward Primer: 5'-TAAGCTTACATGGCGACGAAGGAGG (SEQ ID NO: 149)  
Reverse Primer: 5'-TGGATCCACTTACGTGGACTTGGT (SEQ ID NO: 150)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5 5,00 µL Template cDNA
- 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µL 2mM dNTP
- 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL des 5'-ATG sowie des 3'-Stopp Primers)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase
- 10 Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

- 15 Anzahl der Zyklen: 35

- Das PCR Produkt wurde für 2 h bei 37 °C mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI inkubiert. Der Hefe-Expressionsvektor pYES3 (Invitrogen) wurde in gleicherweise inkubiert. Anschließend wurde das 1104 bp große PCR Produkt sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolge mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und Desaturase-cDNA ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pYES3-Pi-omega3Des wurde durch Sequenzierung überprüft und in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde pYES3 parallel transformiert. Anschliessend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Tryptophan mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die auf ohne Tryptophan im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES3, pYES3-Pi-omega3Des. Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.
- 20
  - 25

- 30 Beispiel 25: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurde mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt.

- 35 PSUN-Pi-omega3Des

Reverse: 3'-GCGGCCGCTTACGTGGACTTGGTC (SEQ ID NO: 147)



Forward: 5'-GCGGCCGCatGGCGACGAAGGAGG (SEQ ID NO: 148)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
  - 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
  - 5 5,00 µL 2mM dNTP
  - 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
  - 0,50 µL Advantage-Polymerase
- Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- 10 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

- Die PCR Produkte wurden für 4 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert.
- 15 Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert.
- Anschließend wurde die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolge mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert.
- 20 Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pSUN-Piomega3Des wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Beispiel 26: Expression von Pi-omega3Des in Hefen

- Hefen, die wie unter Beispiel 24 mit dem Plasmid pYES3 oder pYES3- Pi-omega3Des transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:
- 25 Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei
  - 30 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-
  - 35 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-

Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert. Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum  
5 Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

10 Beispiel 27: Funktionelle Charakterisierung von Pi-omega3Des:

Die Substratspezifität der Pi-omega3Des konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Figur 12 bis 18). Die gefütterten Substrate liegen in großen Mengen in allen transgenen Hefen vor, wodurch die Aufnahme dieser Fettsäuren in die Hefen bewiesen ist. Die transgenen Hefen zeigen die Synthese neuer  
15 Fettsäuren, den Produkten der Pi-omega3Des-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen Pi-omega3Des funktional exprimiert werden konnte.

Figur 12 gibt die Desaturierung von Linolsäure (18:2  $\omega$ -6-Fettsäure) zu  $\alpha$ -Linolensäure (18:3  $\omega$ -3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor  
20 pYES2 (Figur 12 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 12 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup>-Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

In Figur 13 ist die Desaturierung von  $\gamma$ -Linolensäure (18:3  $\omega$ -6-Fettsäure) zu Stearidonsäure (18:4  $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des wiedergegeben.

25 Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 13 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 13 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von  $\gamma$ -C18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup>-Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

30 Figur 14 gibt die Desaturierung von C20:2- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:3- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 14 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 14 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C20:2 <sup>$\Delta$ 11,14</sup>-Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert.  
35 Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Figur 15 gibt die Desaturierung von C20:3- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:4- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch

saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 15 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 15 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C20:3<sup>Δ8,11,14</sup>-Fettsäure (300 μM) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

- 5 In Figur 16 wird die Desaturierung von Arachidonsäure (C20:4-ω-6-Fettsäure) zu Eicosapentaensäure (C20:5-ω-3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des gezeigt.

Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 16 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 16 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimal-  
10 medium in Gegenwart von C20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>-Fettsäure (300 μM) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Figur 17 gibt die Desaturierung von Docosatetraensäure (C22:4-ω-6-Fettsäure) zu Docosapentaensäure (C22:5-ω-3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen,  
15 die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 17 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 17 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C22:4<sup>Δ7,10,13,16</sup>-Fettsäure (300 μM) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Die Substratspezifität der Pi-omega3Des gegenüber verschiedenen Fettsäuren ist  
20 Figur 18 zu entnehmen. Die Hefen, die mit dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt einen Mittelwert aus drei Messungen wieder. Die Umsetzungsraten (%  
25 Desaturation) wurden mit der Formel:  
[Produkt]/([Produkt]+[Substrat])\*100 errechnet.

Wie unter Beispiel 9 beschrieben kann auch die Pi-omega3Des zur Erzeugung transgener Pflanzen verwendet werden. Aus den Samen dieser Pflanzen kann dann die Lipidextraktion wie unter Beispiel 6 beschrieben erfolgen.

- 30 Beispiel 28: Klonierung von Desaturasegenen aus *Ostreococcus tauri*.

Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe von konservierten Motiven (His-Boxen, Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113) konnten fünf Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Ostreococcus tauri* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich  
35 dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren	Homologie
OtD4	SEQ ID NO: 95	536	$\Delta$ -4-Desaturase
OtD5.1	SEQ ID NO: 91	201	$\Delta$ -5-Desaturase
OtD5.2	SEQ ID NO: 93	237	$\Delta$ -5-Desaturase
OtD6.1	SEQ ID NO: 89	456	$\Delta$ -6-Desaturase
OtFad2	SEQ ID NO: 107	361	$\Delta$ -12-Desaturase

Die Alignments zur Auffindung von Homologien der einzelnen Gene wurden mit dem tBLASTn-Aalgorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410) durchgeführt.

5 Die Klonierung erfolgte wie folgt:

40 ml einer *Ostreococcus tauri* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Aqua bidest resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der OtDes-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ l aufgetauten Zellen, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 30 Sekunden,  $55^{\circ}\text{C}$  für 1 Minute und  $72^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten.

Folgende Primer wurden für die PCR eingesetzt:

OtDes6.1 Forward: 5'ggtaccacataatgtgcgtggagacggaaaataacg3' (SEQ ID NO: 145)

OtDes6.1 Reverse: 5'ctcgagttacgccgtcttccggagtgttgcc3' (SEQ ID NO: 146)

20 Beispiel: 29 Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

Zur Charakterisierung der Funktion der Desaturase OtDes6.1 (=  $\Delta$ -6-Desaturase) aus *Ostreococcus tauri* wurde der offene Leserahmen der DNA stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei der entsprechenden pYES2.1-OtDes6.1 Klon erhalten wurde. In entsprechender Art und Weise können weitere Desaturase-Gene aus *Ostreococcus* kloniert werden.



Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pYES2.1-OtDes6.1 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplett-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Für die Expression der OtDes6.1 Desaturase wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert. 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel: 30 Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen werden von den 5'- und 3-Bereich der Desaturasen abgeleitet.

20 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
25 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
30 Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert. Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-

Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide werden durch Sequenzierung verifiziert.

pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Ostreococcus-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-

GTGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA-3', SEQ ID NO: 144).

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von Arabidopsis thaliana, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

#### Beispiel: 31 Expression von OtDes6.1 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2 und pYES2-OtDes6.2 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschliessend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-

Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

- 5 Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel: 32 Funktionelle Charakterisierung von Desaturasen aus *Ostreococcus*:

- Die Substratspezifität von Desaturasen kann nach Expression in Hefe (siehe Beispiele Klonierung von Desaturase-Genen, Hefeexpression) durch die Fütterung mittels verschiedener Hefen ermittelt werden. Beschreibungen für die Bestimmung der  
15 einzelnen Aktivitäten finden sich in WO 93/11245 für  $\Delta 15$ -Desaturasen, WO 94/11516 für  $\Delta 12$ -Desaturasen, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 und WO 99/27111 für  $\Delta 6$ -Desaturasen, Qiu et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 31561-31566 für  $\Delta 4$ -Desaturasen, Hong et al. 2002, *Lipids* 37,863-868 für  $\Delta 5$ -Desaturasen.

- 20 Tabelle 9 gibt die Substratspezifität der Desaturase OtDes6.1 gegenüber verschiedenen Fettsäuren wieder. Die Substratspezifität der OtDes6.1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden. Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtDes6.2-Reaktion  
25 (Fig. 20). Dies bedeutet, dass das Gen OtDes6.1 funktional exprimiert werden konnte.

- Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-OtDes6.1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert (n=3)  $\pm$   
30 Standardabweichung wieder. Die Aktivität entspricht der Konversionsrate errechnet nach  $[\text{Substrat}/(\text{Substrat}+\text{Produkt}) \cdot 100]$ .

- Tabelle 9 zeigt, dass die OtDes6.1 eine Substratspezifität für Linol- und Linolensäure (18:2 und 18:3) aufweist, da mit diesen Fettsäuren die höchsten Aktivitäten erreicht werden. Die Aktivität für Ölsäure (18:1) und Palmitoleinsäure (16:1) ist dagegen deutlich geringer. Die bevorzugte Umsetzung von Linol- und Linolensäure zeigt die
- 5 Eignung dieser Desaturase für die Herstellung von polyungesättigten Fettsäuren.

Substrate	Aktivität in %
16:1 <sup>Δ<sup>9</sup></sup>	5,6
18:1 <sup>Δ<sup>9</sup></sup>	13,1
18:2 <sup>Δ<sup>9,12</sup></sup>	68,7
18:3 <sup>Δ<sup>9,12,15</sup></sup>	64,6

Figur 20 zeigt die Umsetzung von Linolsäure durch OtDes6.1. Die Analyse der FAMES erfolgte über Gaschrommatographie. Das gefütterte Substrat (C18:2) wird zu  $\gamma$ -C18:3 umgesetzt. Sowohl Edukt als auch das entstandene Produkt sind durch Pfeile markiert.

- 10 In Figur 21 wird die Umsetzung von Linolsäure (= LA) und  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA) in Gegenwart von OtDes6.1 zu  $\gamma$ -Linolensäure (= GLA) bzw. Stearidonsäure (= STA) wiedergegeben (Figur 21 A und C). Weiterhin zeigt Figur 21 die Umsetzung von Linolsäure (= LA) und  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA) in Gegenwart der  $\Delta$ -6-Desaturase OtDes6.1 zusammen mit der  $\Delta$ -6-Elongase PSE1 aus *Physcomitrella patens* (Zank et
- 15 al. 2002, Plant J. 31:255-268) und der  $\Delta$ -5-Desaturase PtD5 aus *Phaeodactylum tricornutum* (Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113) zu Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (= DHGLA) und Arachidonsäure (= ARA, Figur 21 B) bzw. zu Dihomostearidonsäure (= DHSTA) bzw. Eicosapentaensäure (= EPA, Figur 21 D). Figur 21 zeigt deutlich, dass die Reaktionsprodukte GLA und STA der  $\Delta$ -6-Desaturase OtDes6.1 in
- 20 Gegenwart der  $\Delta$ -6-Elongase PSE1 fast quantitativ zu DHGLA bzw. DHSTA elongiert wird. Die nachfolgende Desaturierung durch die  $\Delta$ -5-Desaturase PtD5 erfolgt ebenfalls reibungslos zu ARA bzw. EPA. Es werden ca. 25 – 30% des Elongaseprodukts desaturiert (Figur 21 B und D).



Die folgenden Tabelle 10 gibt eine Übersiche über die klonierten *Ostreococcus* Desaturasen wieder:

<u>Ostreococcus tauri Desaturasen</u>							
Name	bp	aa	Homologie	Cyt. B5	His-Box1	His-Box2	His-Box3
OtD4	1611	536	$\Delta$ -4- Desaturase	HPGG	HCANH	WRYHHQVSHH	QVEHHLFP
OtD5.1	606	201	$\Delta$ -5- Desaturase	-	-	-	QVVHHLFP
OtD5.2	714	237	$\Delta$ -5- Desaturase	-	-	WRYHHMVSHH	QIEHHLPF
OtD6.1	1443	480	$\Delta$ -6- Desaturase	HPGG	HEGGH	WNSMHNKHH	QVIHHLFP
OtFAD2	1086	361	$\Delta$ -12- Desaturase	-	HECGH	WQRSHAVHH	HVAHH

Beispiel : 33      Klonierung von Desaturasegenen aus *Thalassiosira pseudonana*

- 5      Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe von konservierten Motiven (His-Boxen, siehe Motive) konnten sechs Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Thalassiosira pseudonana* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren	Homologie
TpD4	SEQ ID NO: 103	503	$\Delta$ -4-Desaturase
TpD5-1	SEQ ID NO: 99	476	$\Delta$ -5-Desaturase
TpD5-2	SEQ ID NO: 101	482	$\Delta$ -5-Desaturase
TpD6	SEQ ID NO: 97	484	$\Delta$ -6-Desaturase
TpFAD2	SEQ ID NO: 109	434	$\Delta$ -12-Desaturase
TpO3	SEQ ID NO: 105	418	$\omega$ -3-Desaturase

10

Die Klonierung erfolgte wie folgt:

40 ml einer *Thalassiosira pseudonana* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Aqua bidest resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die

entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der TpDes-DNAs wurde jeweils mit 1 µl aufgetauten Zellen, 200 µM dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Beispiel: 34      Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

Zur Charakterisierung der Funktion der Desaturasen aus *Thalassiosira pseudonana* wird der offene Leserahmen der jeweiligen DNA stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei der entsprechenden pYES2.1-Klone erhalten werden.

Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wird durch Elektroporation (1500 V) mit den Vektoren pYES2.1-TpDesaturasen transformiert. Als Kontrolle wird eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wird. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgt auf Komplet-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion werden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Für die Expression der Tp-Desaturasen werden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert. 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren werden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wird durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen werden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel: 35      Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen werden von den 5'- und 3-Bereich der Desaturasen abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
- 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µL 2mM dNTP
- 5 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- 10 Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert.

- 15 Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide
- 20 werden durch Sequenzierung verifiziert.

- pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des OCS-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden
- 25 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-
  - 30 GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
  - 35 GGATCTGCTGGCTATGAA-3'; SEQ ID NO: 143)

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

5    Beispiel: 36        Expression von Tp-Desaturasen in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2 und pYES2-TpDesaturasen transformiert werden, werden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen werden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten werden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu werden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren werden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend werden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben werden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse sind wie folgt: Die Ofentemperatur wird von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgt durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids* 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany* 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters* 439(3):215-218.

Beispiel: 37        Funktionelle Charakterisierung von Desaturasen aus *Thalassiosira pseudonana*:

30    Die Substratspezifität von Desaturasen kann nach Expression in Hefe (siehe Beispiele Klonierung von Desaturase-Genen, Hefeexpression) durch die Fütterung mittels verschiedener Hefen ermittelt werden. Beschreibungen für die Bestimmung der einzelnen Aktivitäten finden sich in WO 93/11245 für  $\Delta 15$ -Desaturasen, WO 94/11516 für  $\Delta 12$ -Desaturasen, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, 35    WO0021557 und WO 99/27111 für  $\Delta 6$ -Desaturasen, Qiu et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 31561-31566 für  $\Delta 4$ -Desaturasen, Hong et al. 2002, *Lipids* 37,863-868 für  $\Delta 5$ -Desaturasen.



Die Aktivität der einzelnen Desaturasen wird aus der Konversionsrate errechnet nach der Formel  $[\text{Substrat}/(\text{Substrat}+\text{Produkt}) \cdot 100]$ .

Die folgenden Tabellen 11 und 12 geben eine Übersicht über die clonierten *Thalassiosira pseudonana* Desaturasen wieder.

5 Tabelle 11: Länge und charakteristische Merkmale der clonierten *Thalassiosira* Desaturasen.

Desaturase	cDNA (bp)	Protein (aa)	Cyt. B5	His-Box1	His-Box2	His-Box3
TpD4	1512	503	HPGG	HDGNH	WELQHMLGHH	QIEHHLFP
TpD5-1	1431	476	HPGG	HDANH	WMAQHWTHH	QVEHHLFP
TpD5-2	1443	482	HPGG	HDANH	WLAQHWTHH	QVEHHLFP
TpD6	1449	484	HPGG	HDFLH	WKNKHNGHH	QVDHHLFP
TpFAD2 (d12)	1305	434	-	HECGH	HAKHH	HVAHHLFH
TpO3	1257	419	-	HDAGH	WLFMVTYLQH H	HVVHHLF

Tabelle 12: Länge, Exons, Homologie und Identitäten der clonierten Desaturasen.

Des.	GDN A (bp)	Exon 1	Exon 2	First Blast Hit	Hom./Iden.
TpD4	2633	496-1314	1571-2260	Thrautochitrium D4- des	56% / 43%
TpD5-1	2630	490-800	900-2019	Phaeodactylum D5- des	74% / 62%
TpD5-2	2643	532-765	854-2068	Phaeodactylum D5- des	72% / 61%
TpD6	2371	379-480	630-1982	Phaeodactylum D6- des	83% / 69%
TpFAD2	2667	728-2032	-	Phaeodactylum FAD2	76% / 61%
TpO3	2402	403-988	1073-1743	Chaenorhabdids Fad2	49% / 28%

- 10 Analog zu den vorgenannten Beispielen lassen sich auch die  $\Delta$ -12-Desaturasegene aus *Ostreococcus* und *Thalassiosira* clonieren.

Beispiel 38 Klonierung von Elongase Genen aus *Xenopus laevis* und *Ciona intestinalis*

- 5 Durch Suche nach konservierten Bereichen (siehe Konsensus-Sequenzen, SEQ ID NO: 115 und SEQ ID NO: 116) in den Proteinsequenzen in Gendatenbanken (Genbank) mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität konnten weitere Elongasesequenzen aus anderen Organismen identifiziert und isoliert werden. Aus *X. laevis* bzw. aus *C. intestinalis* konnten mit entsprechenden Motiven jeweils weitere Sequenzen identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	Organismus	Genbank-Nr.	SEQ ID NO:	Aminosäuren
ELO(XI)	<i>Xenopus laevis</i>	BC044967	117	303
ELO(Ci)	<i>Ciona intestinalis</i>	AK112719	119	290

10

Der cDNA Klon von *X. laevis* wurde vom NIH (National Institut of Health) bezogen [Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative, Dev. Dyn. 225 (4), 384-391 (2002)].

- 15 Der cDNA Klon von *C. inetstinalis* wurde von der Universität von Kyto bezogen [Satou,Y., Yamada,L., Mochizuki,Y., Takatori,N., Kawashima,T., Sasaki,A., Hamaguchi,M., Awazu,S., Yagi,K., Sasakura,Y., Nakayama,A., Ishikawa,H., Inaba,K. and Satoh,N. "A cDNA resource from the basal chordate *Ciona intestinalis*" JOURNAL Genesis 33 (4), 153-154 (2002)].

20 Beispiel 39: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen

- 25 Die Amplifizierung der Elongase-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ L cDNA, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U *Advantage*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Für die Klonierung der Sequenz zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Gen-Name und SEQ ID NO:	Primersequenz
ELO(XI) SEQ ID NO: 121	F:5'- AGGATCC <u>ATGGC</u> CTTCAAGGAGCTCACATC
SEQ ID NO: 122	R:5'- CCTCGAGT <u>CAATG</u> GTTTTTGCTTTTCAATG-CACCG
ELO(Ci), SEQ ID NO: 123	F:5'- TAAGCTT <u>ATGG</u> ACGTACTTCATCGT
SEQ ID NO: 124	R:5'- TCAGATCTT <u>TAATC</u> GGTTTTACCATT

\*F=forward primer, R=reverse primer.

- Die PCR Produkte wurde für 30 min bei 21 °C mit dem Hefe-Expressionsvektor - pYES2.1-TOPO (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben inkubiert. Das PCR-Produkt wird dabei durch einen T-Überhang und Aktivität einer Topoisomerase (Invitrogen) nach Herstellerangaben in den Vektor ligiert. Nach der Inkubation erfolgte dann die Transformation von E. coli DH5α Zellen. Entsprechende Klone wurden durch PCR - identifiziert, die Plasmid-DNA mittels Qiagen DNAeasy-Kit isoliert und durch Sequenzierung verifiziert. Die korrekte Sequenz wurde dann in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pYES2.1 parallel transformiert. Anschließend wurden die Hefen auf Komplet-Minimalmedium ohne Uracil mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die ohne Uracil im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES2.1, pYES2.1-ELO(XI) und pYES2.1-ELO(Ci). Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.
- 15 Beispiel 40: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:.

## 20 pSUN-ELO(XI)

Forward: 5'-GCGGCCGCACCATATGGCCTTCAAGGAGCTCACATC (SEQ ID NO: 125)

Reverse: 3'-GCGGCCGCCTTCAATGGTTTTTGCTTTTCAATGCACCG (SEQ ID NO: 126)

## 25 pSUN-ELO(Ci)

Forward: 5'-GCGGCCGCACCATATGGACGTACTTCATCGT (SEQ ID NO: 127)

Reverse: 3'-GCGGCCGCTTTAATCGGTTTTACCATT

(SEQ ID NO: 128)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
- 5 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µL 2mM dNTP
- 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

10 Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

- 15 Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert. Anschliessend wurden die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit
- 20 gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-ELO(XI) und pSUN-ELO(Ci) wurden durch Sequenzierung verifiziert.

- pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP [Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994]. pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem
- 25 in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982) Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert.
- 30
- 35

Primersequenz: 5'-

GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA-3' (SEQ ID NO: 129).



Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

- 5 Die Lipidextraktion aus Hefen und Samen erfolgte identisch zu Beispiel 6.

Beispiel 41: Expression von ELO(XI) und ELO(Ci) in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2, pYES2-ELO(XI) und pYES2-ELO(Ci) transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

- 10 Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit 15 Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850- 20 Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

- Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum 25 Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8): 761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel 42: Funktionelle Charakterisierung von ELO(XI) und ELO(Ci):

- 30 Die Substratspezifität der ELO(XI) konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 22). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der ELO(XI)-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen ELO(XI) funktional exprimiert werden konnte.
- 35 Tabelle 13 zeigt, dass die ELO(XI) eine breite Substratspezifität aufweist. Es werden sowohl C18 als auch C20 Fettsäuren verlängert, wobei ein Bevorzugung von Δ5- und Δ6-desaturierten Fettsäuren zu beobachten ist.

Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-ELO(XI) transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

- 5 Tabelle 13: Expression von ELO(XI) in Hefe. Beschrieben ist die Umsetzungsrate (Konversionsrate) verschiedener Edukte (gefüttert jeweils 250  $\mu$ M).

Edukte	Konversion der Edukte durch ELO(XI) in %
16:0	3
16:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	0
18:0	2
18:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	0
18:2 <sup><math>\Delta</math>9,12</sup>	3
18:3 <sup><math>\Delta</math>6,9,12</sup>	12
18:3 <sup><math>\Delta</math>5,9,12</sup>	13
18:3 <sup><math>\Delta</math>9,12,15</sup>	3
18:4 <sup><math>\Delta</math>6,9,12,15</sup>	20
20:3 <sup><math>\Delta</math>8,11,14</sup>	5
20:3 <sup><math>\Delta</math>11,14,17</sup>	13
20:4 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14</sup>	15
20:5 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14,17</sup>	10
22:4 <sup><math>\Delta</math>7,10,13,16</sup>	0
22:6 <sup><math>\Delta</math>4,7,10,13,16,19</sup>	0

Die Substratspezifität der ELO(Ci) konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 23). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der ELO(Ci)-Reaktion. Dies bedeutet, dass

5 das Gen ELO(Ci) funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 14: Expression von ELO(Ci) in Hefe. Beschrieben ist die Umsetzungsrate (Konversionsrate) verschiedener Edukte (gefüttert jeweils 250  $\mu$ M).

Edukte	Konversion der Edukte durch ELO(Ci) in %
16:0	0
16:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	0
18:0	0
18:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	0
18:2 <sup><math>\Delta</math>9,12</sup>	23
18:3 <sup><math>\Delta</math>6,9,12</sup>	10
18:3 <sup><math>\Delta</math>5,9,12</sup>	38
18:3 <sup><math>\Delta</math>9,12,15</sup>	25
18:4 <sup><math>\Delta</math>6,9,12,15</sup>	3
20:3 <sup><math>\Delta</math>8,11,14</sup>	10
20:3 <sup><math>\Delta</math>11,14,17</sup>	8
20:4 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14</sup>	10
20:5 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14,17</sup>	15
22:4 <sup><math>\Delta</math>7,10,13,16</sup>	0
22:6 <sup><math>\Delta</math>4,7,10,13,16,19</sup>	0

Tabelle 14 zeigt, dass die ELO(Ci) eine breite Substratspezifität aufweist. Es werden sowohl C18 als auch C20 Fettsäuren verlängert, wobei ein Bevorzugung von  $\Delta$ 5- und  $\Delta$ 6-desaturierten Fettsäuren zu beobachten ist.

- 5 Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-ELO(Ci) transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Beispiel 43: Klonierung von Genen aus *Ostreococcus tauri*

- 10 Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der hierin beschriebenen Elongase-Gene mit  $\Delta$ 5-Elongaseaktivität oder  $\Delta$ 6-Elongaseaktivität konnten je zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Ostreococcus tauri* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
OtELO1, ( $\Delta$ 5-Elongase)	SEQ ID NO: 67	300
OtELO1.2, ( $\Delta$ 5-Elongase)	SEQ ID NO: 113	300
OtELO2, ( $\Delta$ 6-Elongase)	SEQ ID NO: 69	292
OtELO2.1, ( $\Delta$ 6-Elongase)	SEQ ID NO: 111	292

- 15 OtElo1 und OtElo1.2 weisen die höchste Ähnlichkeit zu einer Elongase aus *Danio rerio* auf (GenBank AAN77156; ca. 26 % Identität), während OtElo2 und OtElo2.1 die größte Ähnlichkeit zur *Physcomitrella Elo* (PSE) [ca. 36 % Identität] aufweisen (Alignments wurden mit dem tBLASTn-Aalgorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410) durchgeführt.

Die Klonierung der Elongasen wurde wie folgt durchgeführt:

- 20 40 ml einer *Ostreococcus tauri* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Aqua bidest resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon
- 25 trugen. Die Amplifizierung der OtElo-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ l aufgetauten Zellen, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 30
- 30 schritt bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten.



Beispiel 44: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

5 Zur Charakterisierung der Funktion der Elongasen aus *Ostreococcus tauri* wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen DNAs stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei pOTE1, pOTE1.2, pOTE2 und pOTE2.1 erhalten wurden.

10 Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pOTE1, pOTE1.2, pOTE2 bzw. pOTE2.1 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplet-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

15 Für die Expression der Ot-Elongasen wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert. 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

20 Beispiel 45: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

25 Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen wurden von den 5'- und 3-Bereich von OtElo1, OtElo1.2, OtElo2 und OtElo2.1 abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

30 5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

35 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

- Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert. Anschließend wurden die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-OtELO1, pSUN-OtELO1.2, pSUN-OtELO2 und pSUN-OtELO2.2 wurden durch Sequenzierung verifiziert.
- 10 pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP [Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994]. pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des *Ostreococcus*-Gens aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid
- 15 (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region
- 20 des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert.

Primersequenz:

- 25 5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA-3'). (SEQ ID NO: 130)

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/SalI nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

- 30 Beispiel 46: Expression von OtELO1, OtELO1.2, OtELO2 und OtELO2.2 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 15 mit den Plasmiden pYES3, pYES3-OtELO1, pYES3-OtELO1.2, pYES3-OtELO2 und pYES3-OtELO2.2 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

- 35 Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit

Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-  
5 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit  
10 entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

15 Beispiel 47: Funktionelle Charakterisierung von OtElo1, OtElo1.2, OtElo2 und OtElo2.1:

Die Substratspezifität der OtElo1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 15). Die gefütterten Substrate sind in großen  
20 Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen OtElo1 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 15 zeigt, dass OtElo1 bzw. OtElo1.2 eine enge Substratspezifität aufweist. OtElo1 bzw. OtElo1.2 konnte nur die C20-Fettsäuren Eicosapentaensäure (Figur 24A,  
24B) und Arachidonsäure (Figur 25A, 25B) elongieren, bevorzugte aber die ω-3-  
25 desaturierte Eicosapentaensäure.

Tabelle 15 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo1 und OtElo1.2 für C20 polyungesättigte Fettsäuren mit einer Doppelbindung in Δ5 Position gegenüber verschiedenen Fettsäuren.

Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE1 bzw. pOTE1.2 transformiert worden waren,  
30 wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Die Substratspezifität der OtElo2 (SEQ ID NO: 81) OtElo2.1 (SEQ ID NO: 111) konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 16).  
35 Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo2-Reaktion. Dies bedeutet, dass die Gene OtElo2 und OtElo2.1 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 15:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %) OtElo1	Umsatz (in %) OtElo1.2
16:0	-	-
16:1 <sup>Δ9</sup>	-	-
18:0	-	-
18:1 <sup>Δ9</sup>	-	-
18:1 <sup>Δ11</sup>	-	-
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	-	-
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	-	-
18:3 <sup>Δ5,9,12</sup>	-	-
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	-	-
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	10,8 ± 0,6	38,0
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	46,8 ± 3,6	68,6
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	-	-
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	-	-

Tabelle 16 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo2 und OtElo2.1 gegenüber verschiedenen Fettsäuren. OtElo2.1 zeigt eine deutlich höhere Aktivität.

- 5 Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE2 bzw. pOTE2.1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

- 10 Die enzymatische Aktivität, die in Tabelle 16 wiedergegeben wird, zeigt klar, dass OtElo2 bzw. OtElo2.1 eine Δ-6-Elongase ist.



Tabelle 16:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %) OtElo2	Umsatz (in %)OtELO2.2
16:0	-	-
16:1 <sup>Δ9</sup>	-	-
16:3 <sup>Δ7,10,13</sup>	-	-
18:0	-	-
18:1 <sup>Δ6</sup>	-	-
18:1 <sup>Δ9</sup>	-	-
18:1 <sup>Δ11</sup>	-	-
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	-	-
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	15,3	55,7
18:3 <sup>Δ5,9,12</sup>	-	-
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	21,1	70,4
20:2 <sup>Δ11,14</sup>	-	-
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	-	-
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	-	-
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	-	-
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	-	-
22:5 <sup>Δ7,10,13,16,19</sup>	-	-
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	-	-

Figur 24 A – D zeigt die Elongation von Eicosapentaensäure durch OtElo1 (B) bzw. OtElo1.2 (D). Die Kontrollen (A, C) zeigen nicht das Produkt der Elongation (22:5ω3).

5

Figur 25 A – D zeigt die Elongation von Arachidonsäure durch OtElo1 (B) bzw. OtElo1.2 (D). Die Kontrollen (A, C) zeigen nicht das Produkt der Elongation (22:4ω6).

Beispiel 48: Klonierung von Elongase-Genen aus *Euglena gracilis* und *Arabidopsis thaliana*

- 10 Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit Δ-5-Elongaseaktivität oder Δ-6-Elongaseaktivität konnten Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Euglena gracilis*

mit entsprechenden Motiven in Sequenzdatenbanken (Genbank, Euglena EST Bank) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
EGY1019 ( <i>E. gracilis</i> )	SEQ ID NO: 131	262
EGY2019 ( <i>E. gracilis</i> )	SEQ ID NO: 133	262
At3g06460 ( <i>A. thaliana</i> )	SEQ ID NO: 135	298
At3g06470 ( <i>A. thaliana</i> )	SEQ ID NO: 137	278

Die Klonierung der Elongasen aus *Euglena gracilis* wurden wie folgt durchgeführt:

- 5 Der *Euglena gracilis* Stamm 1224-5/25 wurde erhalten von der Sammlung für Algenkulturen Göttingen (SAG). Zur Isolierung wurde der Stamm in Medium II (Calvayrac R and Douce R, FEBS Letters 7:259-262, 1970) für 4 Tage bei 23 °C unter einem Licht-/Dunkelintervall von 8 h / 16 h (35 mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> Lichtstärke) angezogen.

- 10 Gesamt-RNA von einer viertägigen *Euglena* Kultur wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Valencia, CA, US) isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von oligo-dT-Cellulose poly-A<sup>+</sup> RNA (mRNA) isoliert (Sambrook et al., 1989). Die RNA wurde mit dem Reverse Transcription System Kit von Promega revers transkribiert und die synthetisierte cDNA in den lambda ZAP Vektor (lambda ZAP Gold, Stratagene) kloniert. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die cDNA zur Plasmid-DNA entpackt und Klone wurden zur Zufallssequenzierung ansequenziert. Aus der Gesamt-
- 15 RNA wurde mit Hilfe des PolyAtract Isolierungssystems (Promega) mRNA isoliert. Die mRNA wurde mit dem Marathon cDNA Amplification-Kit (BD Biosciences) reverse transkribiert und entsprechend der Herstellerangaben wurden die Adaptoren ligiert. Die cDNA-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden mittels 5'- und 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) verwendet.

- 20 Die Klonierung der Elongasen aus *Arabidopsis thaliana* wurde wie folgt durchgeführt:

Ausgehend von der genomischen DNA wurden für die beiden Gene Primer entsprechend am 5'- und 3'-Ende des offenen Leserahmens abgeleitet.

- 25 Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. thaliana* wurde nach Chirgwin et al., (1979) verfahren. Blätter von 21 Tage alten Pflanzen wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert, mit Aufschlusspuffer versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 4 °C, 12000xg) wurde die RNA im Überstand mit 0,02 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,0 und 0,75 Volumen Ethanol bei -20 °C für 5 h präzipitiert. Die RNA wurde dann nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 1 mL TES pro g Ausgangsmaterial aufgenommen, einmal mit einem Volumen Phenol-Chloroform und
- 30 einmal mit einem Volumen Chloroform extrahiert und die RNA mit 2,5 M LiCl gefällt. Nach anschliessendem Zentrifugieren und Waschen mit 80 %igem Ethanol wurde die RNA in Wasser resuspendiert. Entsprechend Sambrook et al. 1989 wurde die cDNA

synthetisiert und RT-PCR mit den abgeleiteten Primer durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden nach Herstellerangaben in den Vektor pYES2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert.

Beispiel 49: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

- 5 Zur Charakterisierung der Funktion der Elongasen aus *A. thaliana* wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen DNAs stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei pAt60 und pAt70 erhalten wurden.
- 10 Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pAt60 bzw. pAt70 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2.1 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplet-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.
- 15 Für die Expression der At-Elongasen wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert.
- 20 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel 50: Expression von pAt60 und pAt70 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 5 mit den Plasmiden pYES2.1, pAt60 bzw. pAt70 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

- 25 Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei
- 30 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-
- 35 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm; 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel 51: Funktionelle Charakterisierung von pAt60 und pAt70

Die Substratspezifität der Elongasen At3g06460 bzw. At3g06470 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 17, Fig. 26). Die gefütterten Substrate sind in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der Gene At3g06460 bzw. At3g06470. Dies bedeutet, dass diese Gene funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 17: Elongation von EPA durch die Elongasen At3g06460 bzw. At3g06470. Messung der Hefeextrakte nach Fütterung mit 250 uM EPA.

Gen	Gefütterte Fettsäure	Gehalt anC20:5n-3	Gehalt an C22:5n-3
At3g06460	EPA (C20:5n-3)	20.8	0,6
At3g06460	EPA (C20:5n-3)	25,4	1,1
Konversionsrate von EPA		At3g06460: 3,0 %	At3g06470: 4,1 %

Figur 26 gibt die Elongation von 20:5n-3 durch die Elongasen At3g06470 wieder.

Beispiel 52: Klonierung einer Elongase aus *Phaeodactylum tricornutum*

Ausgehend von konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität wurden degenerierte Primer hergestellt und mit diesen eine *Phaeodactylum* cDNA Bank mittels PCR durchsucht. Folgende Primer-Sequenzen wurden eingesetzt:

Primer-Name	Sequenz 5'-3' Orientierung	Korrespondierende Aminosäuren
Phaelo forward1	AA(C/T)CTUCTUTGGCTUTT(C/T)TA (SEQ ID NO. 185)	NLLWLIFY
Phaelo reverse1	GA(C/T)TGUAC(A/G)AA(A/G)AA(C/T)TGUG C(A/G)AA (SEQ ID NO. 186)	FAQFFVQS



Nukleotidbasen in Klammern bedeuten, dass eine Mischung von Oligonukleotiden mit jeweils der einen oder anderen Nukleotidbase vorliegen.

Herstellung der *Phaeodactylum* cDNA Bank:

- 5 Eine 2 L Kultur von *P. tricornutum* UTEX 646 wurde in f/2 Medium (Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (Eds. Smith, W.L. and Chanley, M.H.), Plenum Press, New York, pp 29–60.) für 14 d (= Tage) bei einer Lichtstärke von 35 E/cm<sup>2</sup> angezogen. Gefrorene Zellen wurden nach Zentrifugation in der Gegenwart von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen und mit 2 mL Homogenisierungspuffer (0,33 M Sorbitol, 0,3 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2% SDS, 2% Mercaptoethanol in 0,2 M Tris-Cl pH 8,5) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 mL Phenol und 2 mL Chloroform wurde 15 min kräftig bei 40–50 °C geschüttelt. Anschliessend wurde zentrifugiert (10 min x 10000g) und die wässrige Phase schrittweise mit Chloroform extrahiert. Nukleinsäuren wurden dann durch Zugabe von 1/20 Volumen 4 M Natriumhydrogencarbonatlösung gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 mM Tris-borat pH 7,0 und 1 mM EDTA aufgenommen und die RNA mit 8 M Lithiumchlorid gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das RNA-Pellet mit Rnase-freiem Wasser aufgenommen. Poly(A)-RNA wurde mit Dynabeads (Dynal, Oslo, Norwegen) nach Herstellerangaben isoliert und die Erst-Strang-cDNA-Synthese mit MLV-Rtase von Roche (Mannheim) durchgeführt. Die Zweit-Strang-Synthese erfolgte dann mittels DNA Polymerase I und Klenow Fragment, gefolgt von einem RnaseH Verdau. Die cDNA wurde mit T4 DNA Polymerase behandelt und anschliessend EcoRI/XhoI Adaptoren (Pharmacia, Freiburg) mittels T4 Ligase angehängt. Nach XhoI Verdau, Phosphorylierung und Geltrennung wurden Fragmente grösser als 300 bp entsprechend der Herstellerangaben in den lambda ZAP Express Phagen ligiert (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Nach Massenexcision der cDNA-Bank und Plasmid-Rückgewinnung wurde die Plasmid-Bank in *E. coli* DH10B Zellen transformiert und zur PCR-Sichtung eingesetzt.

- 30 Mittels den oben genannten degenerierten Primern konnte das PCR-Fragment mit der Sequenznummer SEQ ID NO: 187 generiert werden.

Dieses Fragment wurde mit Digoxigenin markiert (Roche, Mannheim) und als Sonde für die Sichtung der Phagen-Bank verwendet.

- 35 Mit Hilfe der Sequenz SEQ ID NO: 187 konnte die Gensequenz SEQ ID NO: 183 erhalten werden, die das Volllängen-RNA-Molekül der  $\Delta 6$ -Elongase von *Phaeodactylum* darstellt:

Beispiel 53: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in - Hefen

Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292)

- neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der PtELO6-DNA wurde jeweils mit 1 µL cDNA, 200 µM dNTPs, 2,5 U Advantage-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30
- 5 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Für die Klonierung der Sequenz zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Gen-Name und SEQ ID NO:	Primersequenz
PtELO6 (SEQ ID NO: 183)	F:5'-GCGGCCGCGCACATAATGATGGTACCTTCAAG (SEQ ID NO: 188)  R:3'- GAAGACAGCTTAATAGACTAGT (SEQ ID NO: 189)

\*F=forward primer, R=reverse primer

- 10 Die PCR Produkte wurden für 30 min bei 21 °C mit dem Hefe-Expressionsvektor - pYES2.1-TOPO (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben inkubiert. Das PCR-Produkt (siehe SEQ ID NO: 192) wurde dabei durch einen T-Überhang und Aktivität einer
- 15 Topoisomerase (Invitrogen) in den Vektor ligiert. Nach der Inkubation erfolgte dann die Transformation von E. coli DH5α Zellen. Entsprechende Klone wurden durch PCR - identifiziert, die Plasmid-DNA mittels Qiagen DNAeasy-Kit isoliert und durch Sequen-
- 20 zierung verifiziert. Die korrekte Sequenz wurde dann in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pYES2.1 parallel transformiert. Anschließend wurden die Hefen auf Komplet-Minimalmedium ohne Uracil mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die ohne
- Uracil im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES2.1 und pYES2.1-PtELO6. Nach der Selektion wurden je zwei Trans-
- formaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Beispiel 54: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- 25 Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wird mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:.

PSUN-PtELO6

- Forward: 5'-GCGGCCGCGACCATGATGGTACCTTCAAGTTA (SEQ ID NO: 190)
- 30 Reverse: 3'-GAAGACAGCTTAATAGGCGGCCGC (SEQ ID NO: 191)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
- 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µL 2mM dNTP
- 5 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- 10 Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert.

- 15 Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschließend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wird das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmide
- 20 pSUN-PtELO wird durch Sequenzierung verifiziert.

- pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert.
- 25
  - 30

- (Primersequenz: 5'-
- 35 GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
  - GGATCTGCTGGCTATGAA-3'; SEQ ID NO: 151).

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeich-

nung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Die Lipidextraktion aus Hefen und Samen erfolgte identisch zu Beispiel 6.

#### Beispiel 55: Expression von PtElo in Hefen

- 5 Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2 und pYES2-PtELO6 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

#### Beispiel 56: Funktionelle Charakterisierung von PtELO6:

In Figur 29 ist die Umsetzung von C18:3<sup>Δ6,9,12</sup> und C18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup> wiedergegeben. Die Substrate werden um je zwei Kohlenstoffatome elongiert es entstehen jeweils die Fettsäuren C20:3<sup>Δ8,11,14</sup> bzw. C20:4<sup>Δ8,11,14,17</sup>. Die Substratspezifität von PtELO6 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 30). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der PtElo6-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen PtELO6 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 18 zeigt, dass die PtElo6 eine enge Substratspezifität aufweist. PtELO6 konnte nur die C18-Fettsäuren Linolsäure, Linolensäure, γ-Linolensäure und Stearidonsäure elongieren, bevorzugte aber die ω-3-desaturierte Stearidonsäure (siehe auch Figur 30).



Fütterungsexperiment: Fettsäuren (fett) wurden jeweils mit 250  $\mu$ M zugegeben. Die unterstrichenen Fettsäuren wurden neu gebildet.

Tabelle 18: Substratspezifität der PtElo6

gefütterte Fettsäure:		+ 18:2	+ 18:3	+ 18:3	+ 18:4
16:0	16,2	18,2	15,2	20	04:48
16:1	50,6	20,5	22,8	33,5	34,2
18:0	5,4	6,3	6,2	5,2	12,4
18:1	27,7	14,6	19,6	19,3	16,7
18:2		40			
18:3			32,9		
18:3				12,3	
18:4					4,5
20:2		<u>0,4</u>			
20:3			<u>3,4</u>		
20:3				<u>9,7</u>	
20:4					<u>14,5</u>
% Elongation	0,0	0,99	9,37	44,09	76,32

5 Folgende Fettsäuren wurden gefüttert, aber nicht umgesetzt:

- 18:1 <sup>$\Delta 6$</sup> , 18:1 <sup>$\Delta 9$</sup> , 18:1 <sup>$\Delta 11$</sup>
- 20:2 <sup>$\Delta 11,14$</sup> , 20:3 <sup>$\Delta 11,14,17$</sup> , 20:3 <sup>$\Delta 8,11,14$</sup> , 20:4 <sup>$\Delta 5,8,11,14$</sup> , 20:5 <sup>$\Delta 5,8,11,14,17$</sup>
- 22:4 <sup>$\Delta 7,10,13,16$</sup>

10 Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-PtELO6 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. So wurden die Ergebnisse, die in den Figuren 29 und 30 sowie in der Tabelle 16 dargestellt wurden, ermittelt.

Äquivalente:

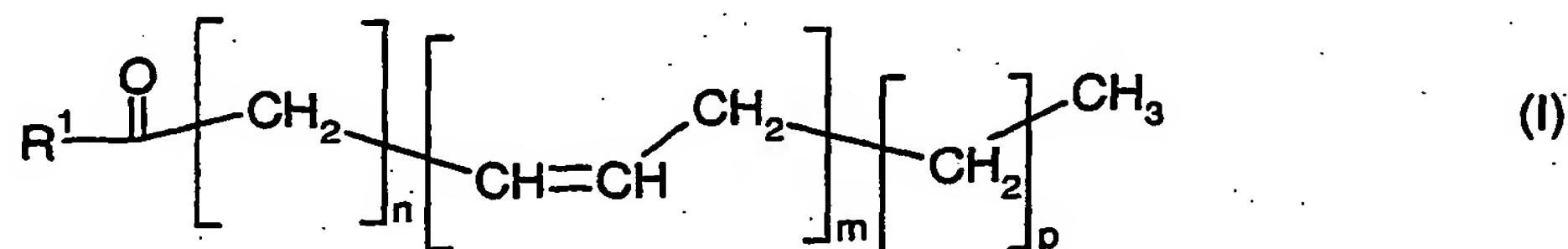
15 Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst sein.

Tabelle 3: Umsetzungsraten der gefütterten Fettsäuren. Die Konversionsraten wurden berechnet nach der Formel:  
[Konversionsrate]= [Produkt]/[[Substrat]+[Produkt]]\*100.

BioTaur-Klone Fläche in % der GC-Analyse														
Clone	Fett-säure	C16:0	C16:1 (n-7)	C18:0	C18:1 (n-9)	C18:3 (n-6)	C18:4 (n-3)	C20:3 (n-6)	C20:4 (n-6)	C20:4 (n-3)	C20:5 (n-3)	C22:4 (n-6)	C22:4 (n-3)	C22:5 (n-3)
Vector	keine	21.261	41.576	4.670	25.330									
BioTaur	Keine	20.831	37.374	4.215	26.475									
Vector	GLA + EPA	22.053	23.632	5.487	17.289	11.574					13.792			
BioTaur	GLA + EPA	20.439	25.554	6.129	19.587	3.521		6.620			10.149			1.127
Vector	EPA	20.669	28.985	6.292	21.712						16.225			
BioTaur	EPA	20.472	26.913	6.570	23.131						11.519			3.251
Vector	ARA	23.169	23.332	6.587	12.735				27.069					
BioTaur	ARA	20.969	31.281	5.367	21.351				9.648			1.632		
Vector	SDA	18.519	12.626	6.642	6.344		47.911							
BioTaur	SDA	19.683	15.878	7.246	8.403		13.569			25.946			0.876	

## Patentansprüche

## 1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I

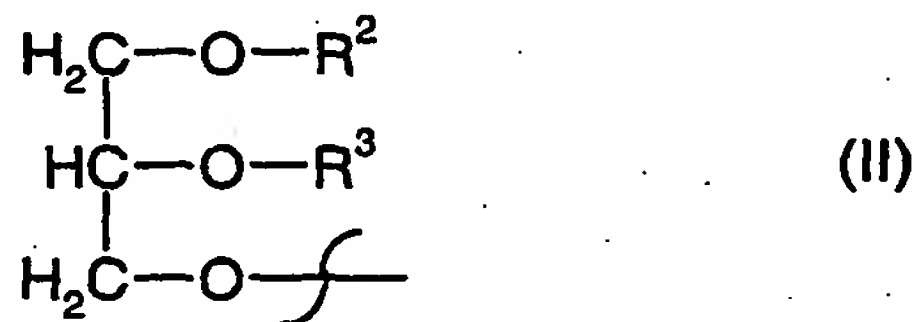


in transgenen Organismen mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.-% dieser Verbindungen bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -9-Elongase- oder eine  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität codiert, und
- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -8-Desaturase- oder eine  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität codiert, und
- c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität codiert, und
- d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität codiert, und
- e) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität codiert, und

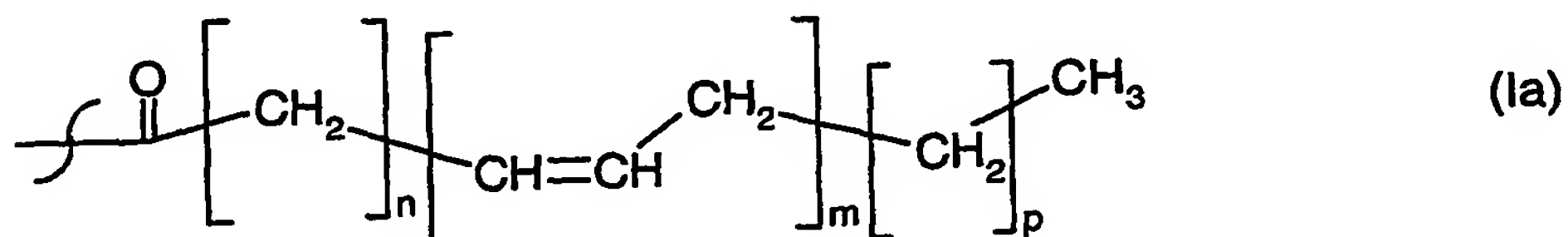
wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

$\text{R}^1 =$  Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



$R^2$  = Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes  $C_2$ - $C_{24}$ -Alkylcarbonyl-,

5  $R^3$  = Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes  $C_2$ - $C_{24}$ -Alkylcarbonyl-, - oder  $R^2$  oder  $R^3$  unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:



$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $9$ ,  $m = 2, 3, 4, 5$  oder  $6$  und  $p = 0$  oder  $3$ .

10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:

15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Sequenz, oder

35 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38,



5 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46,  
 SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54,  
 SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66,  
 SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74,  
 SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ  
 ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID  
 NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO:  
 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO:  
 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO:  
 10 136, SEQ ID NO: 138 oder SEQ ID NO: 184 dargestellten Aminosäure-  
 sequenzen ableiten lassen, oder

c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID  
 NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15,  
 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23,  
 15 SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31,  
 SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39,  
 SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47,  
 SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59,  
 SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67,  
 20 SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75,  
 SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ  
 ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID  
 NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO:  
 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO:  
 25 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO:  
 137 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für  
 Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit  
 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID  
 NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:  
 30 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26,  
 SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34,  
 SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42,  
 SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50,  
 SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62,  
 35 SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70,  
 SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78,  
 SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ  
 ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID  
 NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID  
 NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID  
 40 NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138 oder  
 SEQ ID NO: 184 codieren und eine  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -  
 8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -  
 4-Desaturaseaktivität aufweisen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in den Organismus eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die für Polypeptide mit  $\omega$ 3-Desaturasaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- 5 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Sequenz, oder
- 10 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 codieren und eine  $\omega$ 3-Desaturasaktivität aufweisen.
- 15 4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in den Organismus eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturasaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- 20 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 107 oder SEQ ID NO: 109 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 107 oder SEQ ID NO: 110 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturasaktivität aufweisen.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten  $R^2$  oder  $R^3$  unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes  $C_{18}$ - $C_{22}$ -Alkylcarbonyl- bedeuten.
- 30 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten  $R^2$  oder  $R^3$  unabhängig voneinander ungesättigtes  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - oder  $C_{22}$ -Alkylcarbonyl- mit mindestens zwei Doppelbindungen bedeuten.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus ein transgener Mikroorganismus oder eine transgene Pflanze ist.
- 35

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus eine Öl-produzierende Pflanze, eine Gemüsepflanze oder Zierpflanze ist.
- 5 9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die transgene Organismus eine transgene Pflanze ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien: Adelotheceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Crypthecodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrachaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae oder Prasinophyceae ist.
- 10 10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel I aus dem Organismus in Form ihrer Öle, Lipide oder freien Fettsäuren isoliert werden.
- 15 11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel I in einer Konzentration von mindestens 5 Gew.-% bezogenen auf den gesamten Lipidgehalt des transgenen Organismus isoliert werden.
- 20 12. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11 umfasst und von transgenen Pflanzen stammt.
- 25 14. Verfahren zur Herstellung von Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen durch Mischen von Öl, Lipide oder Fettsäuren gemäß Anspruch 12 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 13 mit tierischen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren.
- 30 15. Verwendung von Öl, Lipide oder Fettsäuren gemäß Anspruch 12 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 13 oder Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen hergestellt gemäß Anspruch 14 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.
- 35 16. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codiert und die eine Aminosäuresequenz enthält ausgewählt aus der Gruppe einer Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141 oder SEQ ID NO: 142 dargestellten Sequenz.

17. Isolierte Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codiert, eine Kombination der Aminosäuresequenzen enthält ausgewählt aus der Gruppe:
- 5 a) SEQ ID NO: 115 und SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 115 und SEQ ID NO: 140 oder SEQ ID NO: 139 und SEQ ID NO: 140; oder
- b) SEQ ID NO: 116 und SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 116 und SEQ ID NO: 142 oder SEQ ID NO: 141 und SEQ ID NO: 142; oder
- 10 c) SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 139 und SEQ ID NO: 140 oder SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 141 und SEQ ID NO: 142.
18. Isolierte Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 16 oder 17, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codieren, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe:
- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131 oder SEQ ID NO: 133 dargestellten Sequenz,
- 20 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 132 oder SEQ ID NO: 134 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 131 oder SEQ ID NO: 133 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 132 oder SEQ ID NO: 134 codieren und eine  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität aufweisen.
- 30
- 35



19. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 111 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Sequenz,
  - 5 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 112 oder SEQ ID NO: 184 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
  - 10 c) Derivate der in SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 111 oder SEQ ID NO: 183 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 112 oder SEQ ID NO: 184 codieren und eine  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität aufweisen.
20. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Sequenz,
  - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
  - 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 aufweisen und eine  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 25
21. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 89 oder in SEQ ID NO: 97 dargestellten Sequenz,
  - 30 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 90 oder SEQ ID NO: 98 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
  - c) Derivate der in SEQ ID NO: 89 oder SEQ ID NO: 97 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 90 oder SEQ ID NO: 98 codieren und eine  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 35

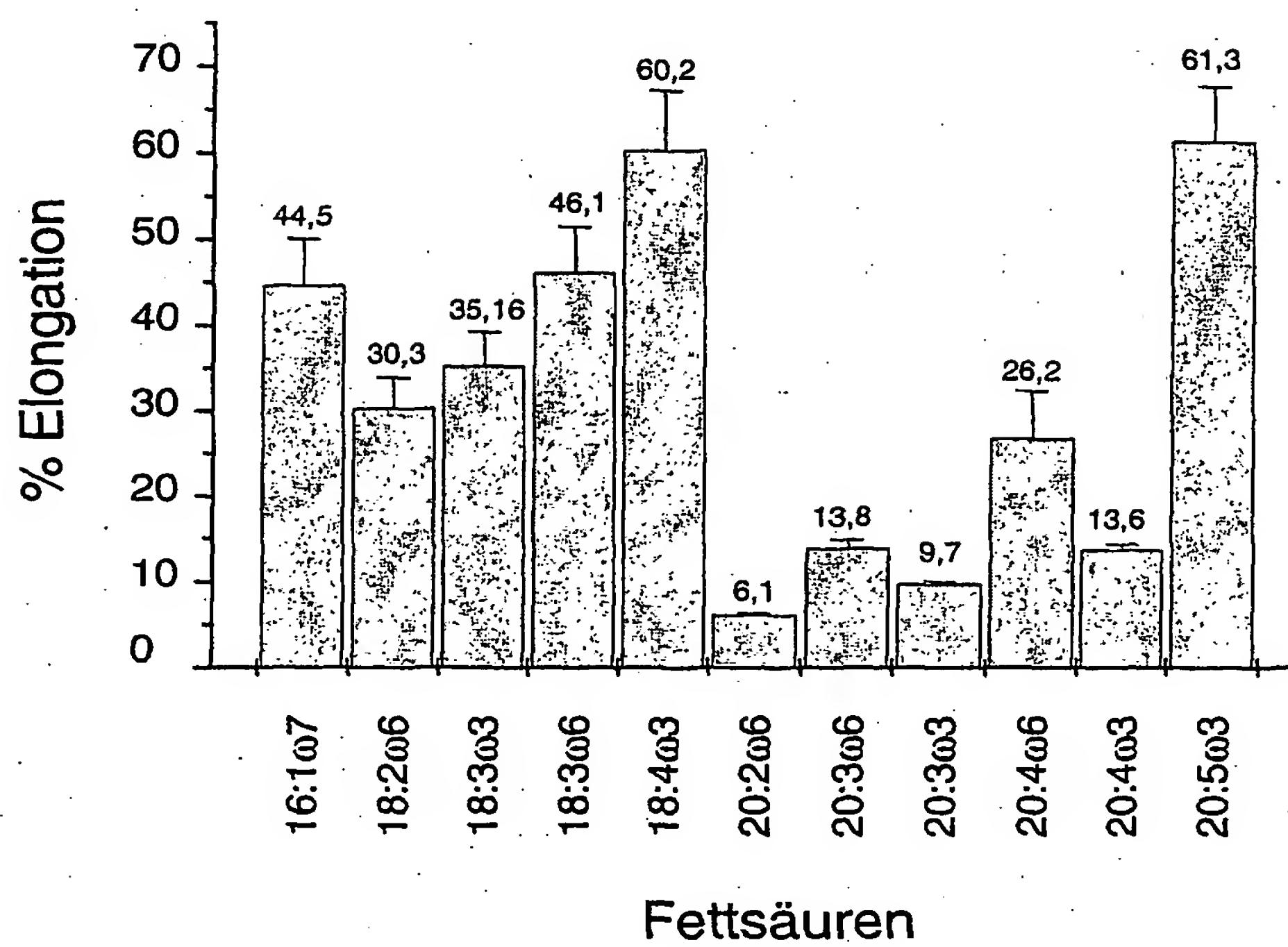
22. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- 5 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 99 oder in SEQ ID NO: 101 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 100 oder in SEQ ID NO: 102 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 10 c) Derivate der in SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 99 oder in SEQ ID NO: 101 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 100 oder in SEQ ID NO: 102 codieren und eine  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 15 23. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 95 oder in SEQ ID NO: 103 dargestellten Sequenz,
- 20 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 96 oder SEQ ID NO: 104 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 95 oder SEQ ID NO: 103 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 96 oder SEQ ID NO: 104 codieren und eine  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 25 24. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 107 oder SEQ ID NO: 109 dargestellten Sequenz, oder
- 30 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 107 oder SEQ ID NO: 109 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 50 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 108 oder SEQ ID NO: 110 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 35

25. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 16 bis 24, wobei die Sequenz von einer Alge, einem Pilz, einem Mikroorganismus, einer Pflanze oder einem nicht-humanen Tier stammt.
- 5 26. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 16 bis 25, wobei die Sequenz aus der Ordnung Salmoniformes, den Diatomeengattungen Thalassiosira oder Crythecodinium oder aus der Familie der Prasinophyceae, Euglenaceae oder Pythiaceae stammt.
27. Aminosäuresequenz, die von einer isolierten Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 16 bis 26 codiert wird.
- 10 28. Genkonstrukt, enthaltend eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 16 bis 26, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.
- 15 29. Genkonstrukt nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n).
- 20 30. Genkonstrukt nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -9-Elongase.
- 25 31. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 16 bis 26 oder ein Genkonstrukt nach den Ansprüchen 28 bis 30.
- 30 32. Transgener nicht-humaner Organismus, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 16 bis 26, ein Genkonstrukt nach den Ansprüchen 28 bis 30 oder einen Vektor nach Anspruch 31.
33. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 32, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein nicht-humanes Tier oder eine Pflanze ist.
- 35 34. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 32 oder 33, wobei der Organismus eine Pflanze ist.

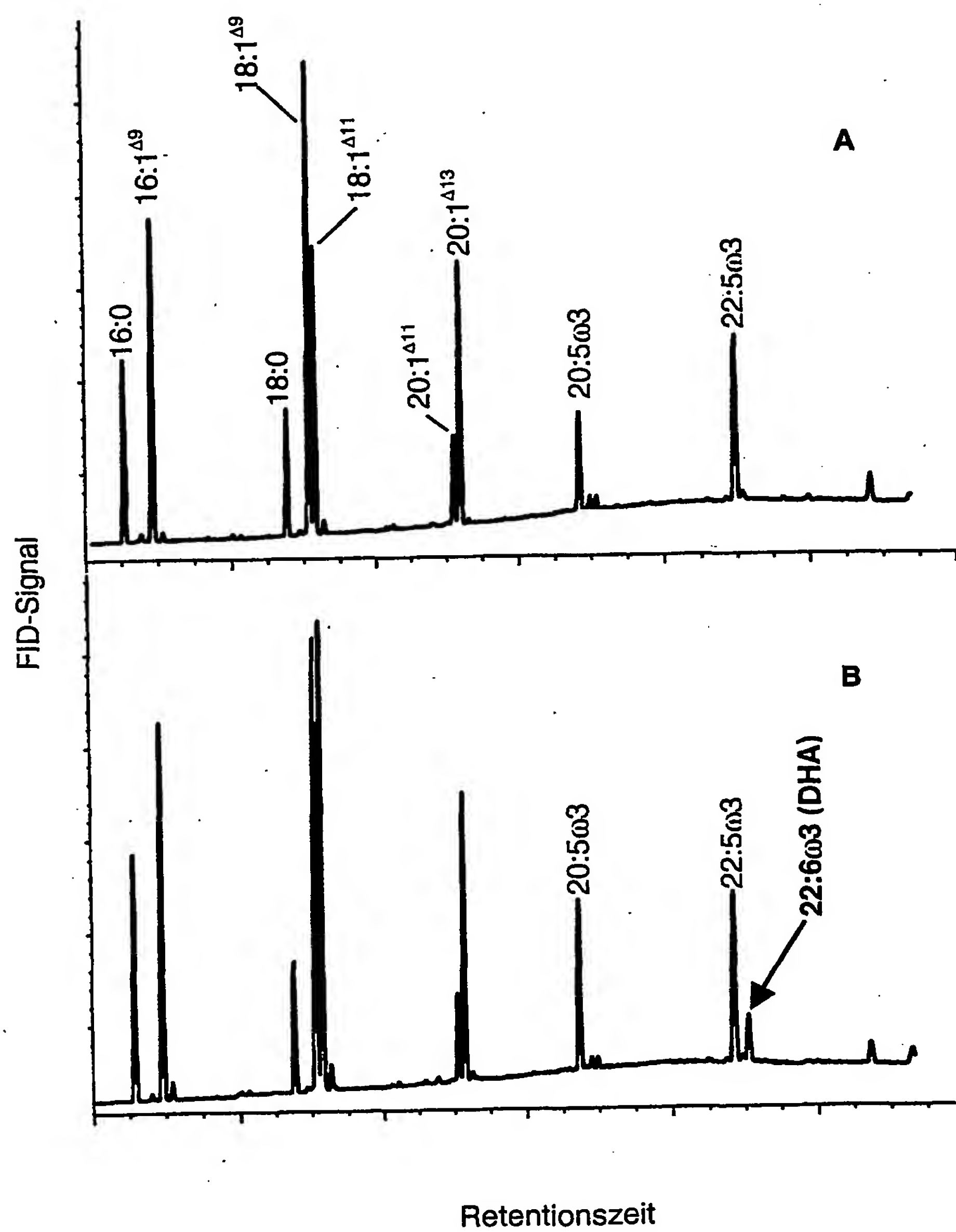


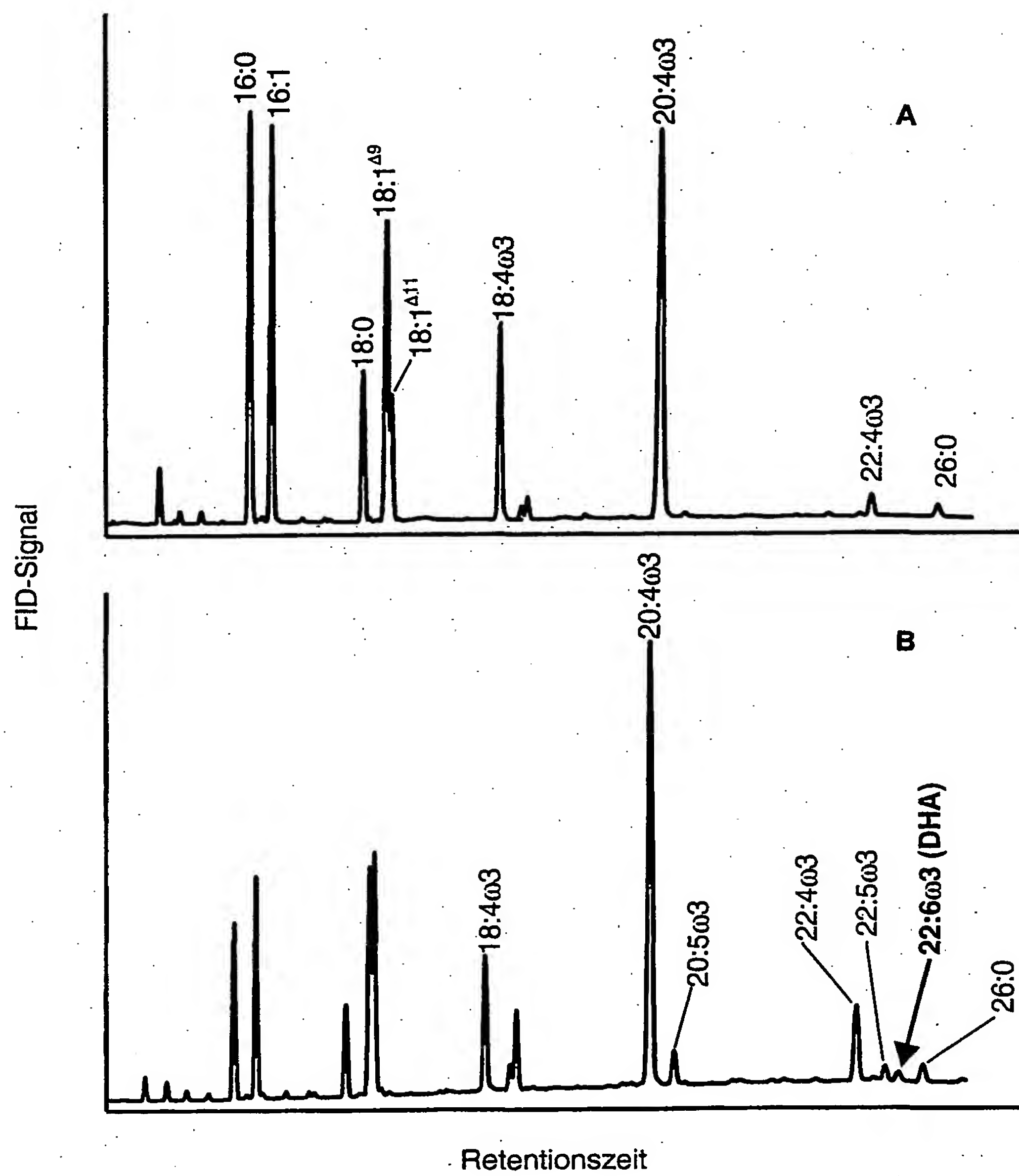


Figur 2: Substratspezifität der  $\Delta$ -5-Elongase (SEQ ID NO: 53) gegenüber verschiedenen Fettsäuren



Figur 3: Rekonstitution der DHA-Biosynthese in Hefe ausgehend von 20:5 $\omega$ 3.



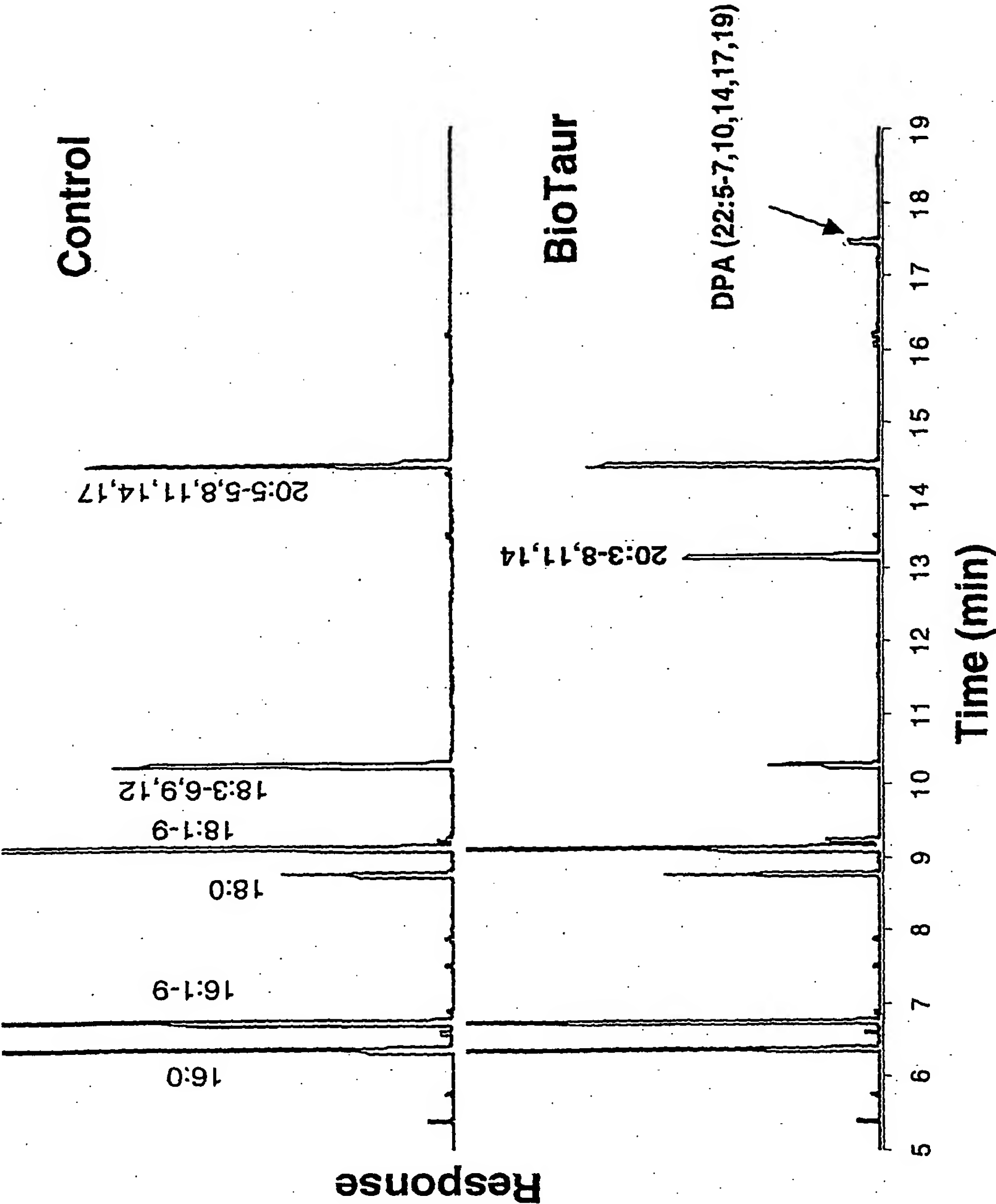
Figur 4: Rekonstitution der DHA-Biosynthese in Hefe ausgehend von 18:4 $\omega$ 3.

Figur 5: Fettsäure-Zusammensetzung (in Mol %) transgener Hefen, die mit den Vektoren pYes3-OmELO3/pYes2-EgD4 oder pYes3-OmELO3/pYes2-EgD4+pESCLEu-PtD5 transformiert worden waren. Die Hefezellen wurden in Minimalmedium ohne Tryptophan und Uracil / und Leucin in Gegenwart von 250  $\mu$ M 20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$  bzw. 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$  kultiviert. Die Fettsäuremethylester wurden durch saure Methanolyse aus Zellsedimenten gewonnen und über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert (n=4)  $\pm$  Standardabweichung wieder.

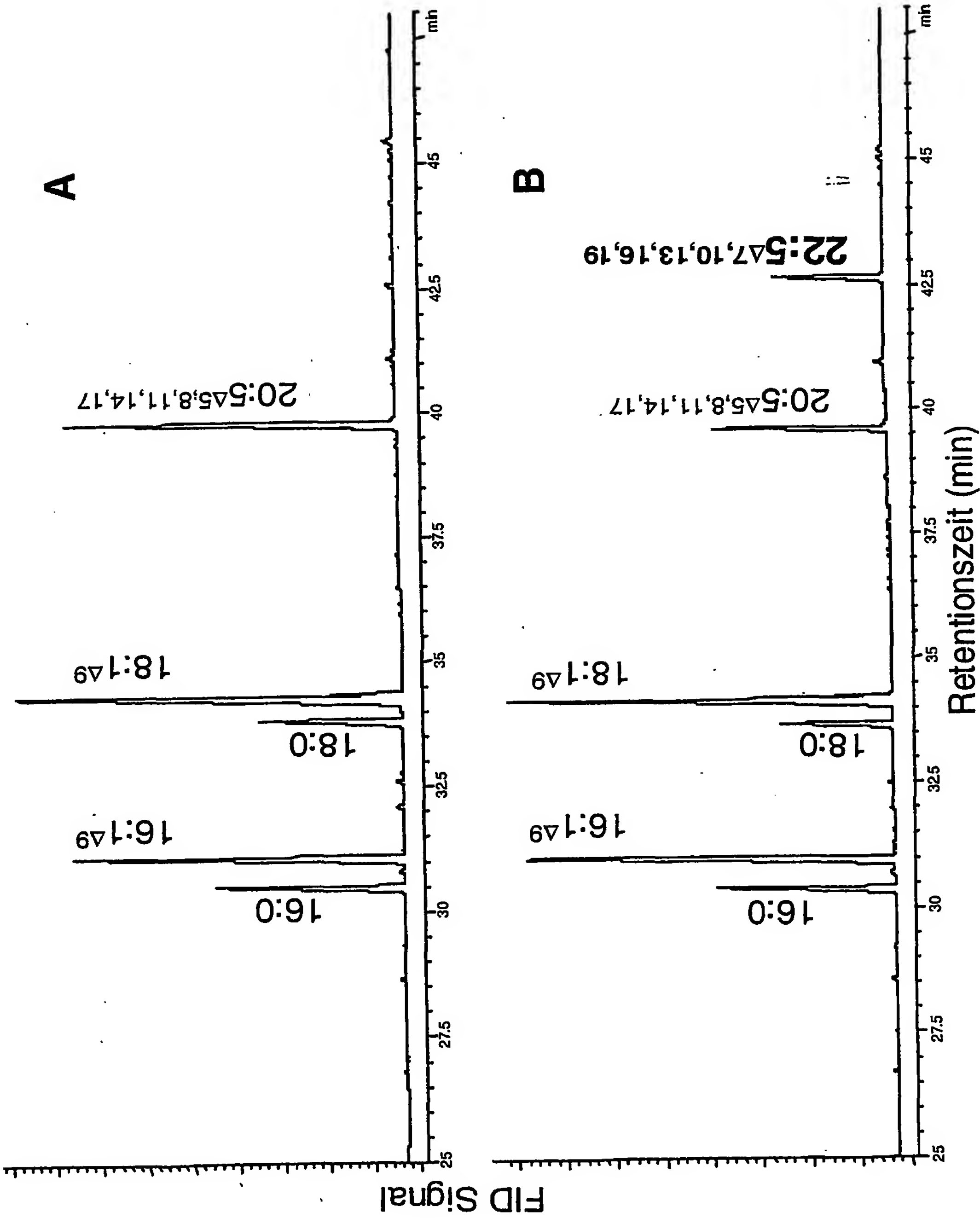
	pYes3-OmELO/pYes2-EgD4	pYes3-OmELO/pYes2-EgD4 EgD4 + pESCLEu-PtD5
Fettsäuren	Fütterung mit 20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$	Fütterung mit 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$
16:0	9,35 $\pm$ 1,61	7,35 $\pm$ 1,37
16:1 $^{\Delta 9}$	14,70 $\pm$ 2,72	10,02 $\pm$ 1,81
18:0	5,11 $\pm$ 1,09	4,27 $\pm$ 1,21
18:1 $^{\Delta 9}$	19,49 $\pm$ 3,01	10,81 $\pm$ 1,95
18:1 $^{\Delta 11}$	18,93 $\pm$ 2,71	11,61 $\pm$ 1,48
18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$	-	7,79 $\pm$ 1,29
20:1 $^{\Delta 11}$	3,24 $\pm$ 0,41	1,56 $\pm$ 0,23
20:1 $^{\Delta 13}$	11,13 $\pm$ 2,07	4,40 $\pm$ 0,78
20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$	-	30,05 $\pm$ 3,16
20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$	6,91 $\pm$ 1,10	3,72 $\pm$ 0,59
22:4 $^{\Delta 10,13,16,17}$	-	5,71 $\pm$ 1,30
22:5 $^{\Delta 7,10,13,16,19}$	8,77 $\pm$ 1,32	1,10 $\pm$ 0,27
22:6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$	2,73 $\pm$ 0,39	0,58 $\pm$ 0,10



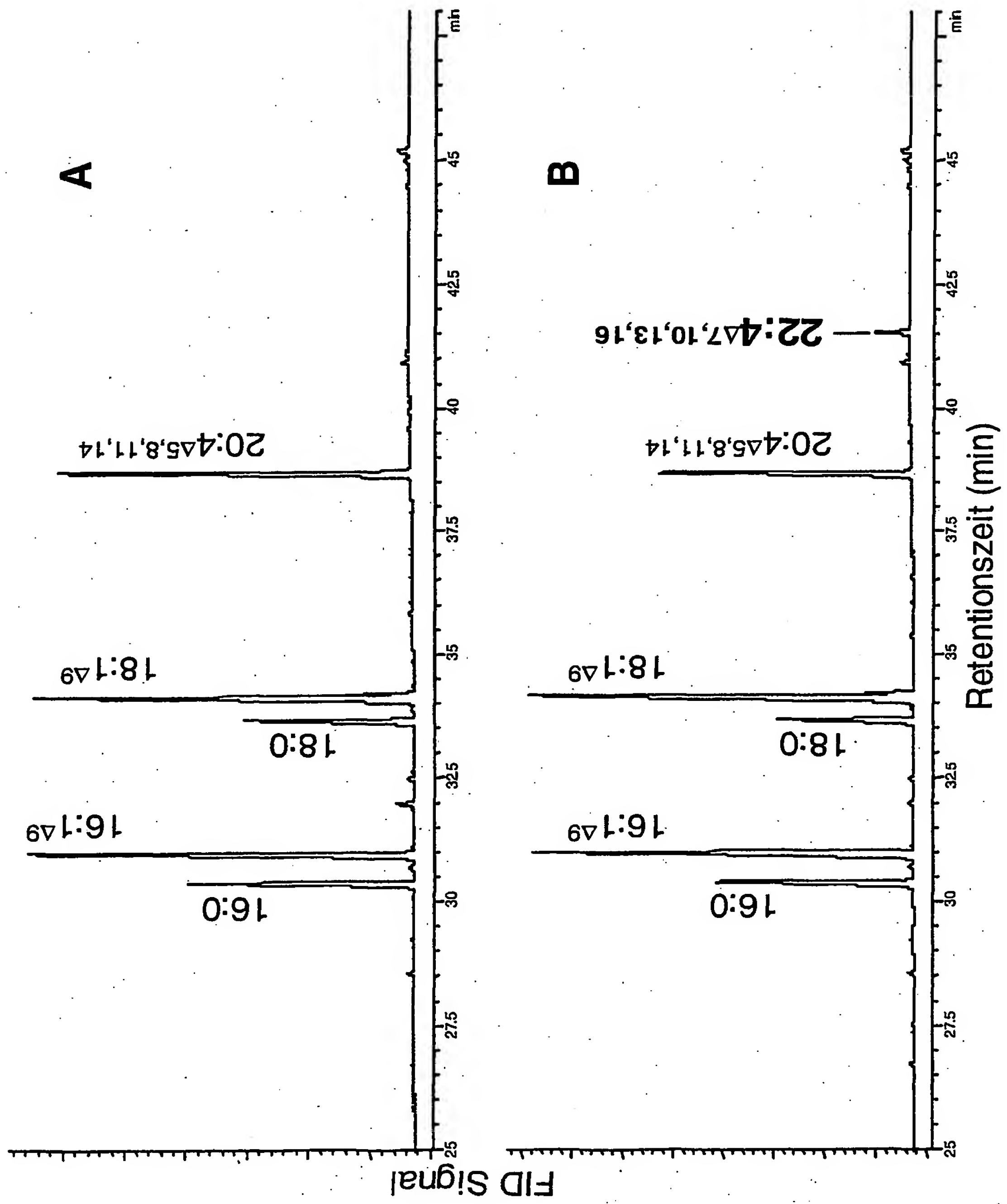
Figur 6: Fütterungsexperiment zur Bestimmung der Funktionalität und Substratspezifität mit Hefestämmen



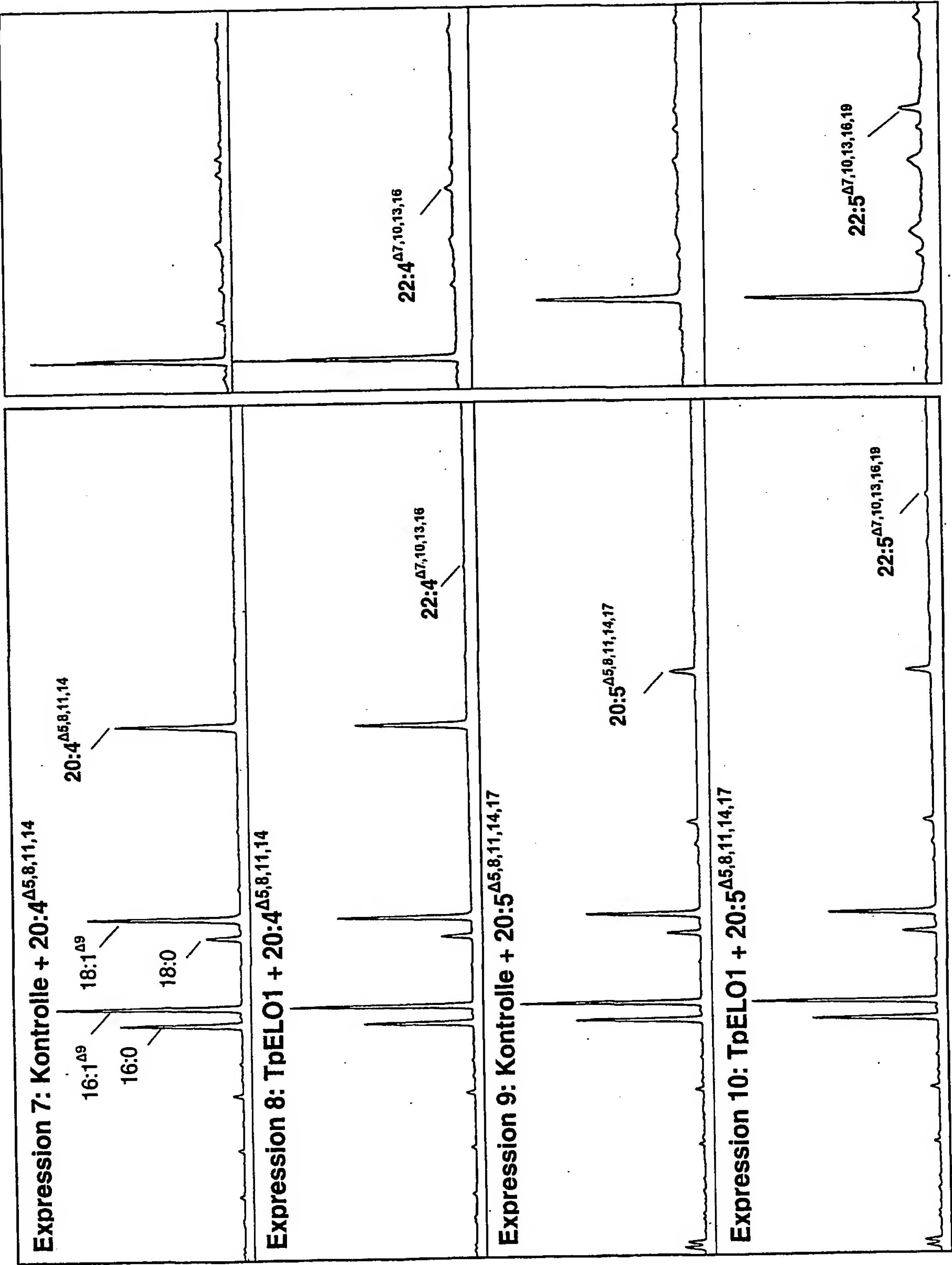
Figur 7: Elongation von Eicosapentaensäure durch OtElo1



Figur 8: Elongation von Arachidonsäure durch OtElo1

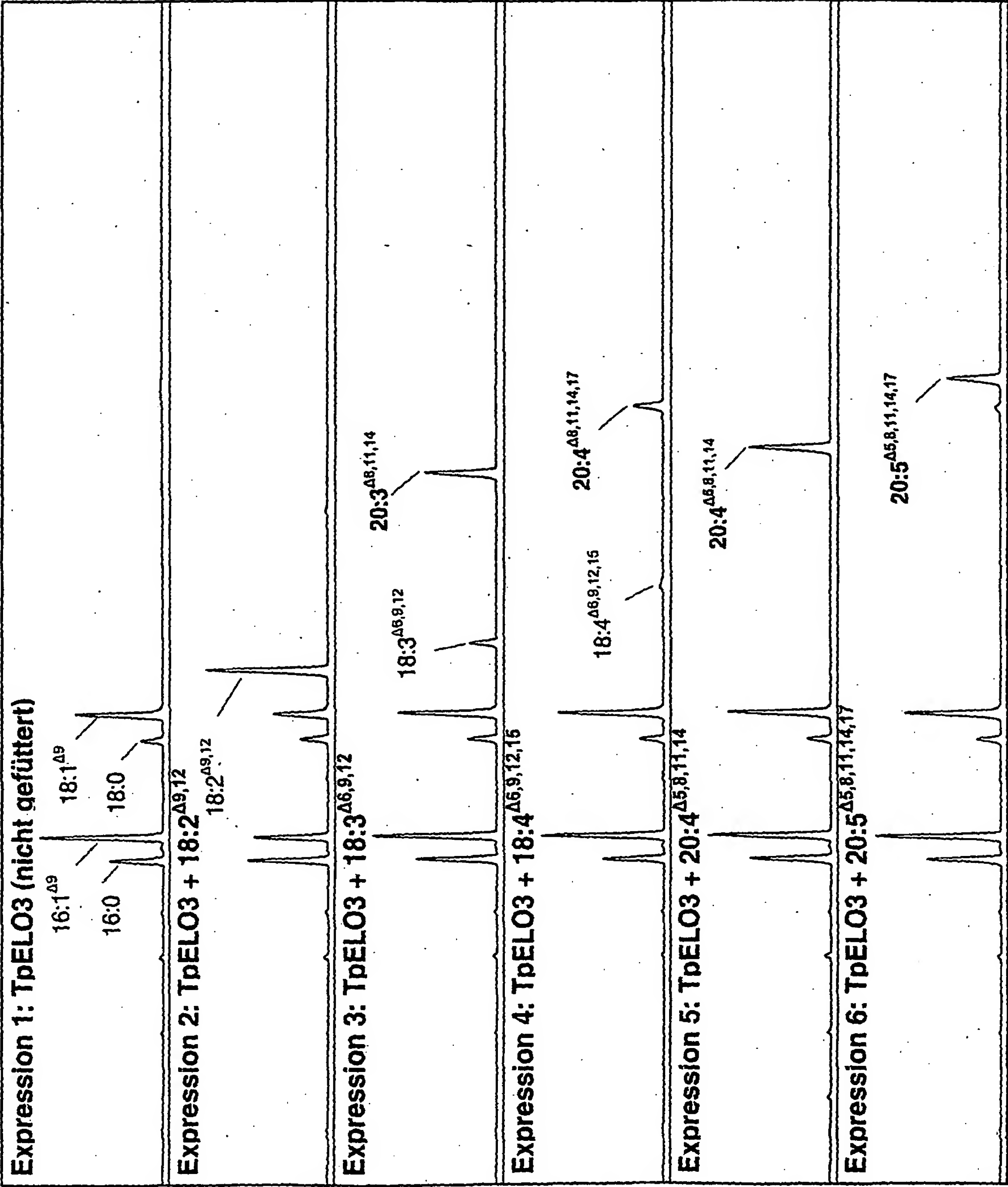


Figur 9: Expression von TpELO1 in Hefe

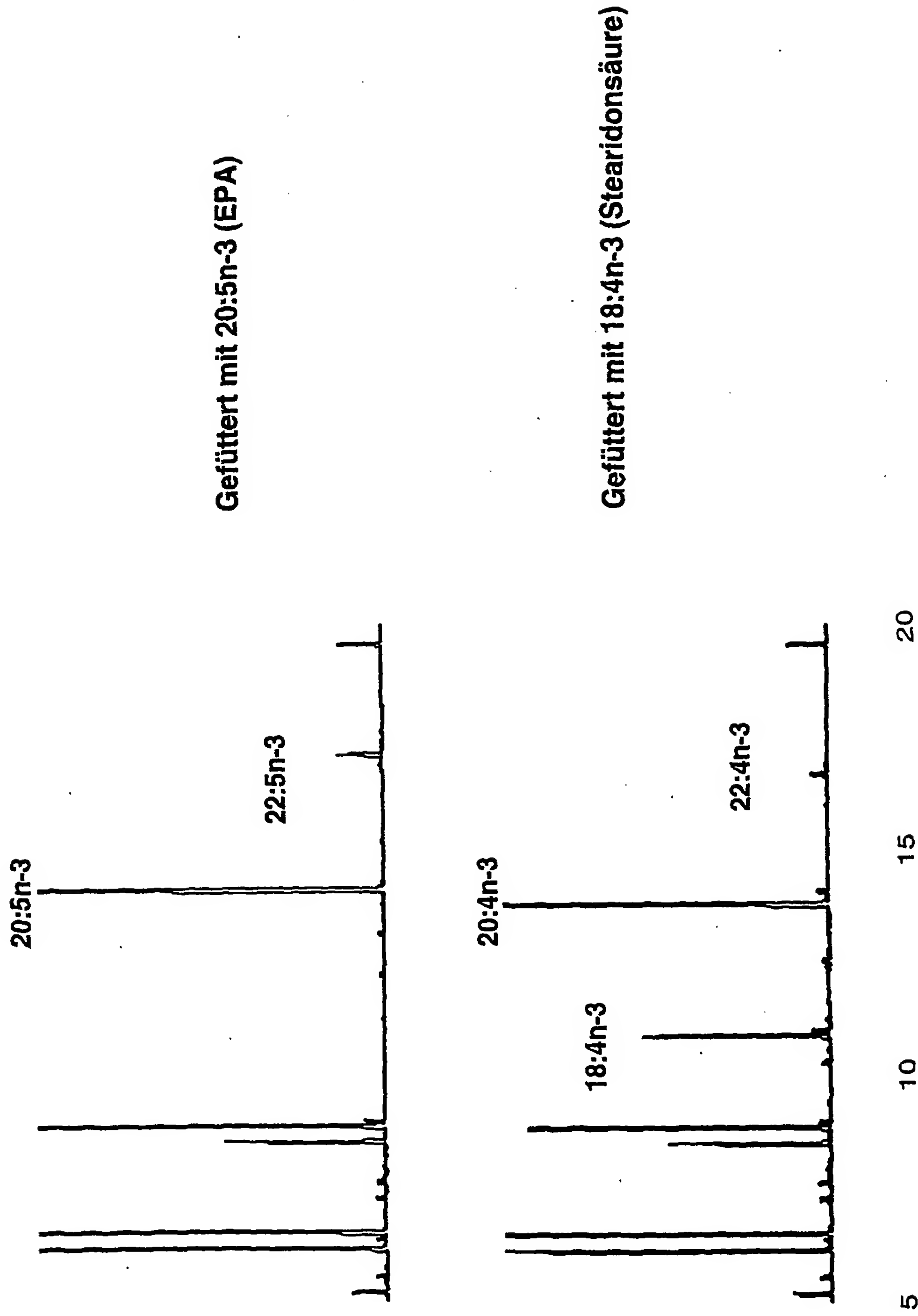




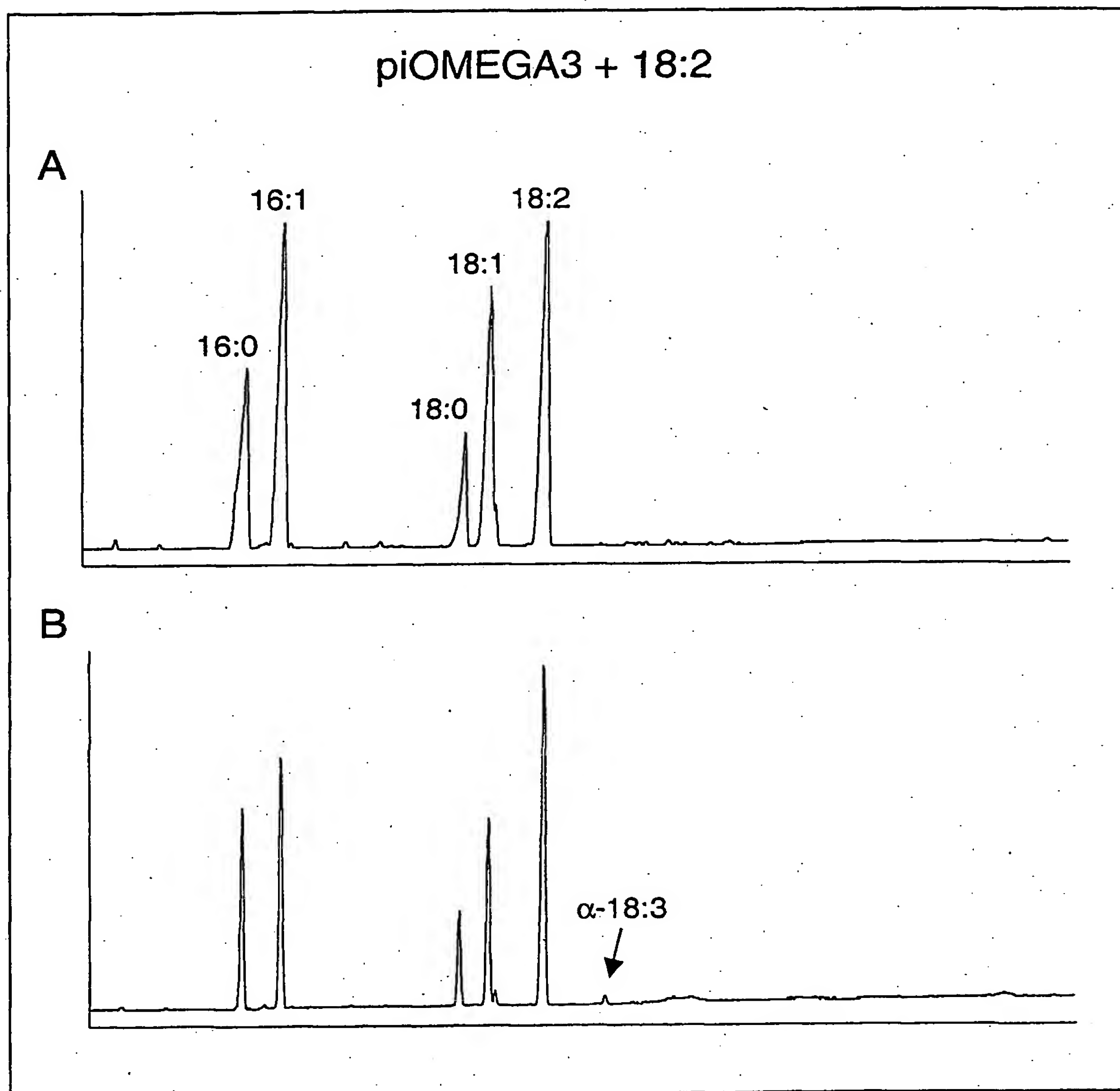
Figur 10: Expression von TpELO3 in Hefe.



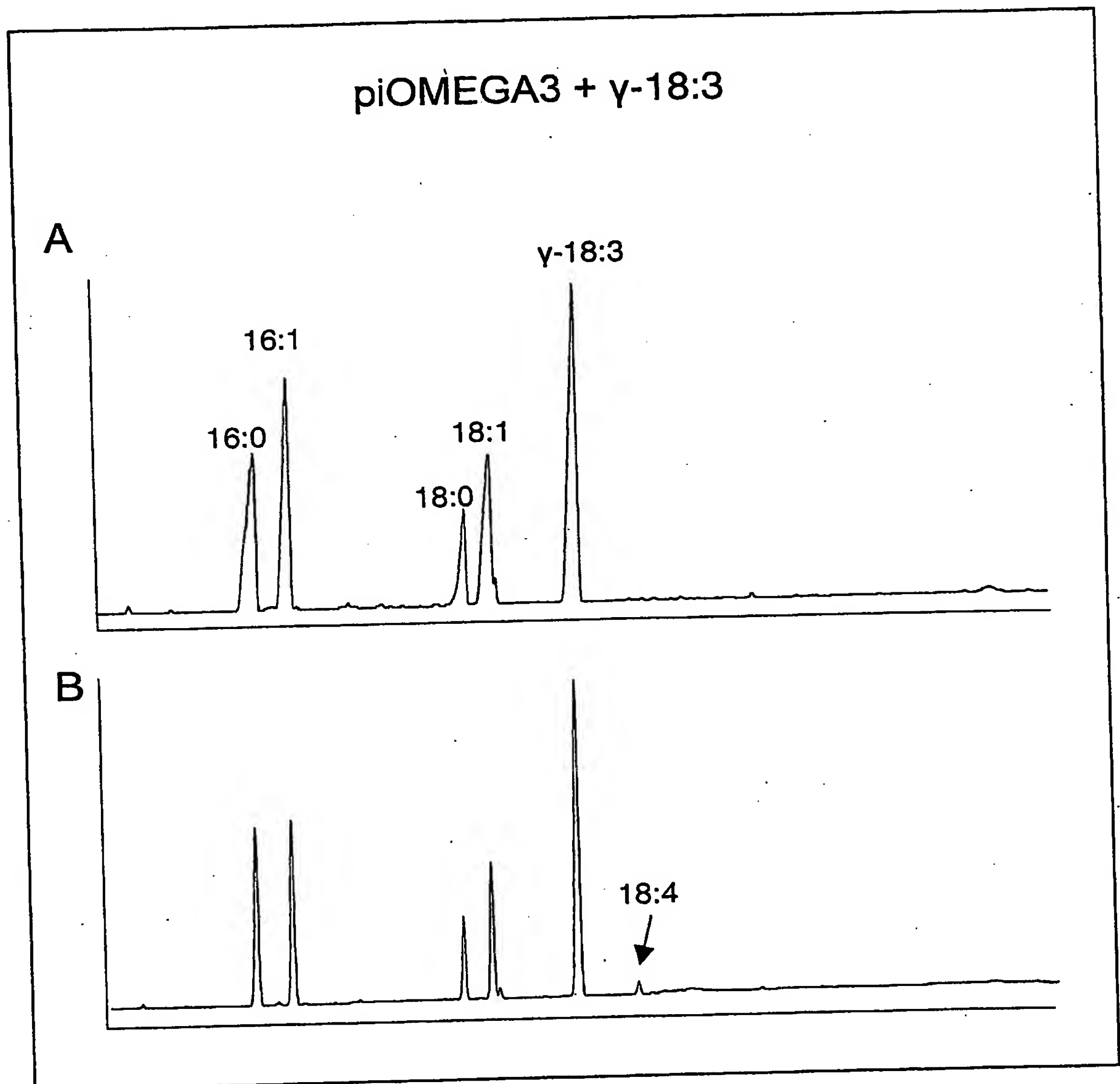
Figur 11: Expression von Thraustochytrium Δ5-Elongase TL16/pYES2.1 in Hefe.



Figur 12: Desaturierung von Linolsäure (18:2  $\omega$ -6-Fettsäure) zu  $\alpha$ -Linolensäure (18:3  $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.

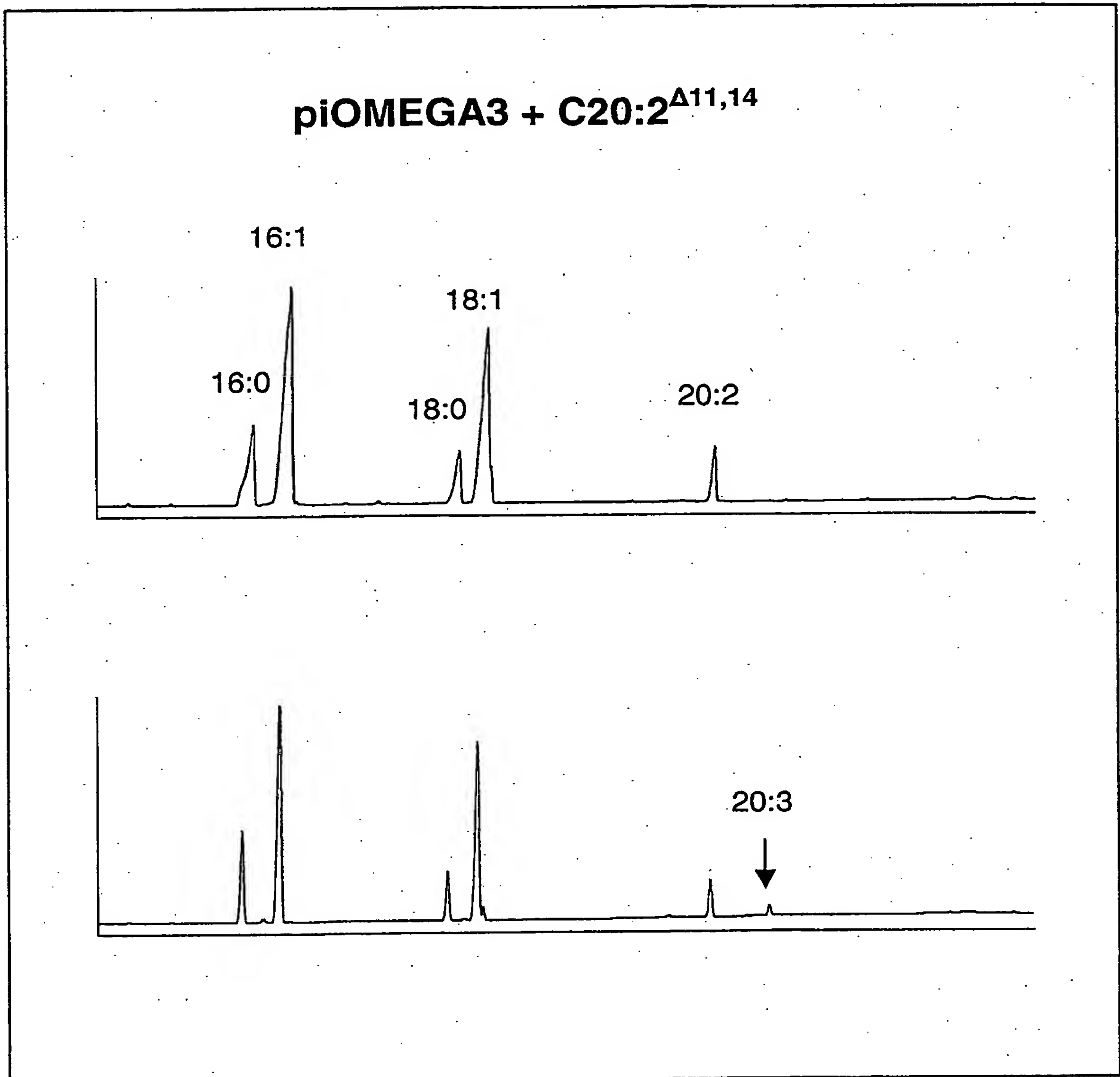


Figur 13: Desaturierung von  $\gamma$ -Linolensäure (18:3  $\omega$ -6-Fettsäure) zu Stearidonsäure (18:4  $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.

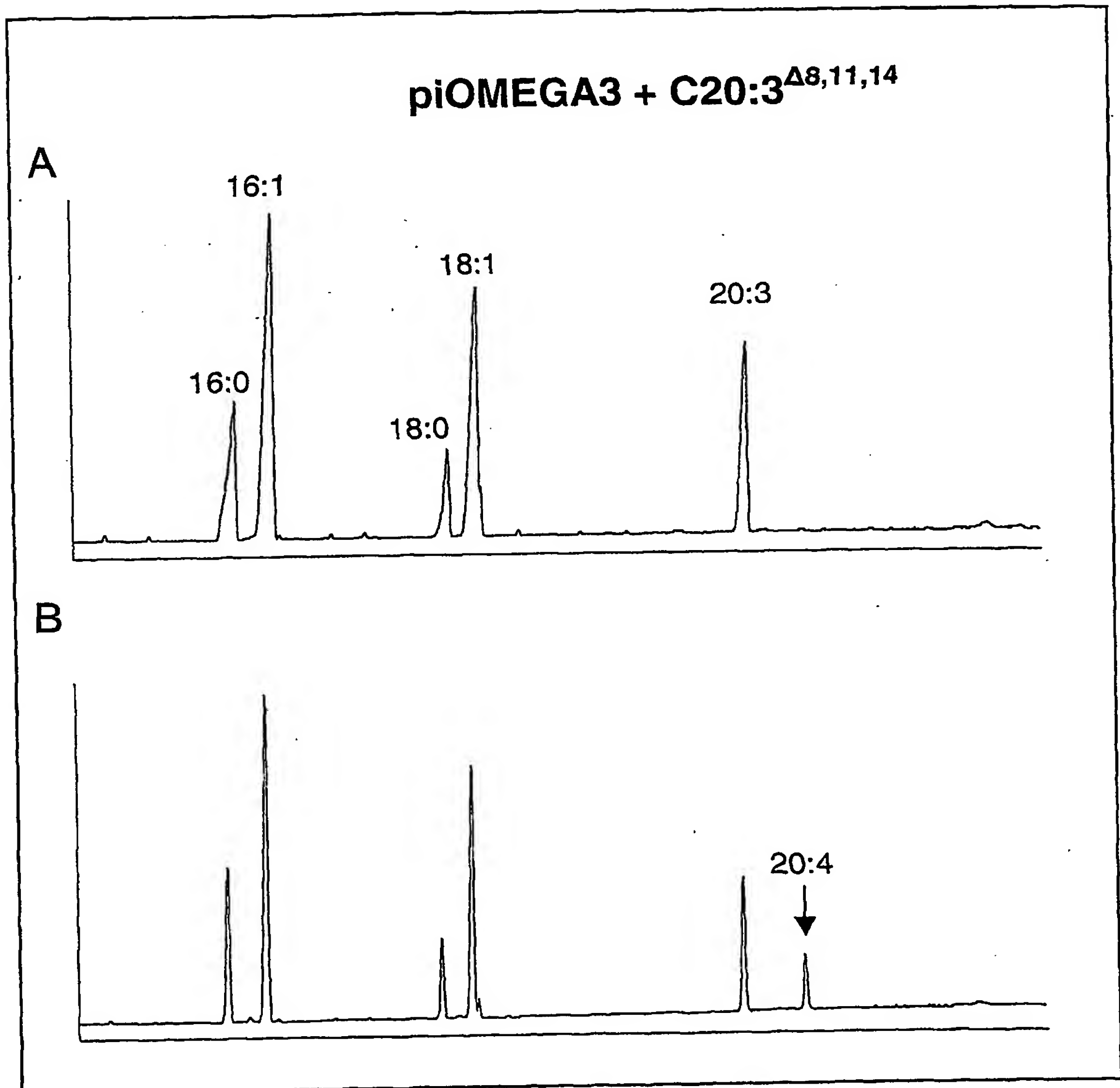




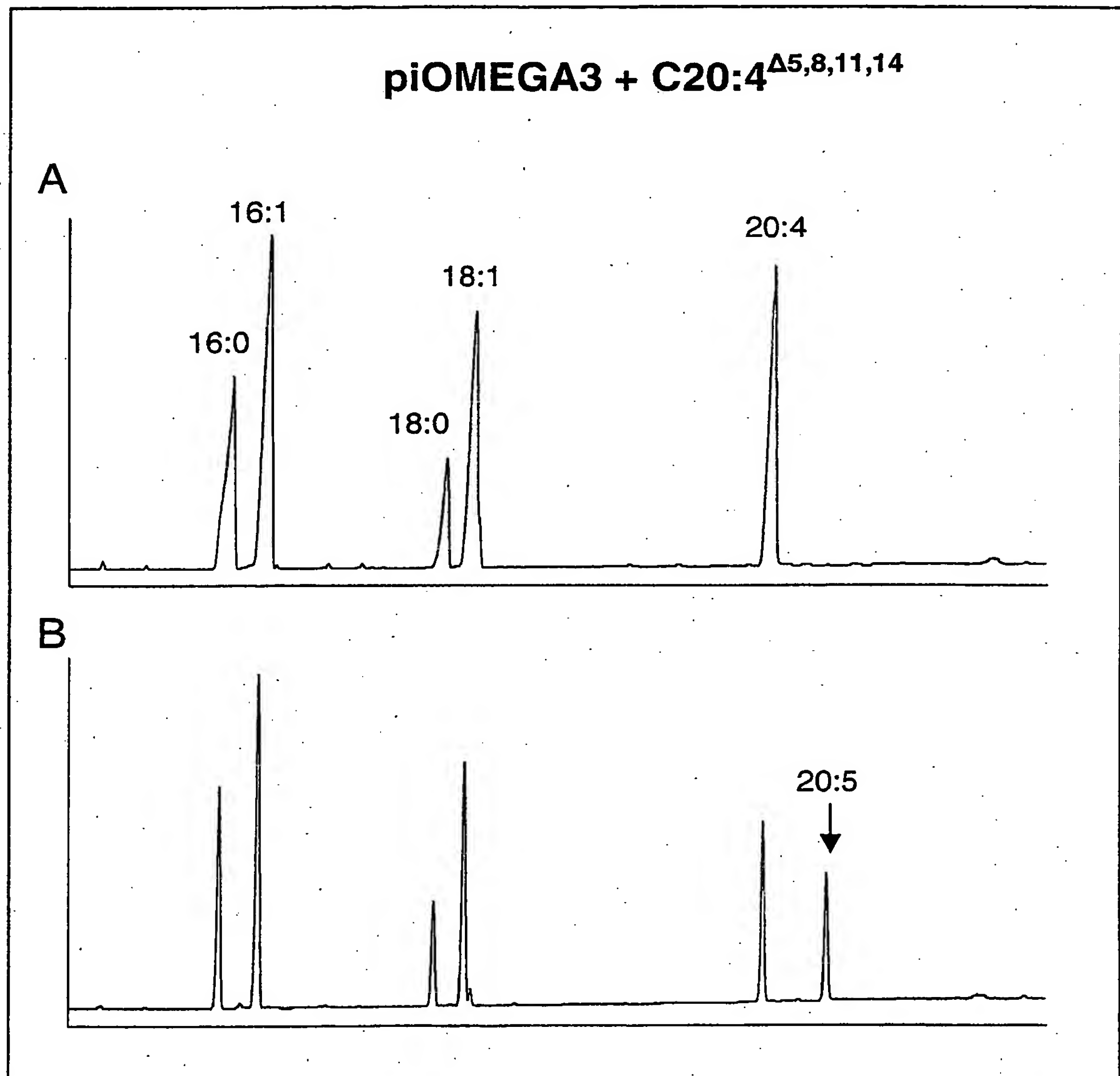
Figur 14: Desaturierung von C20:2  $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:3  $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des.



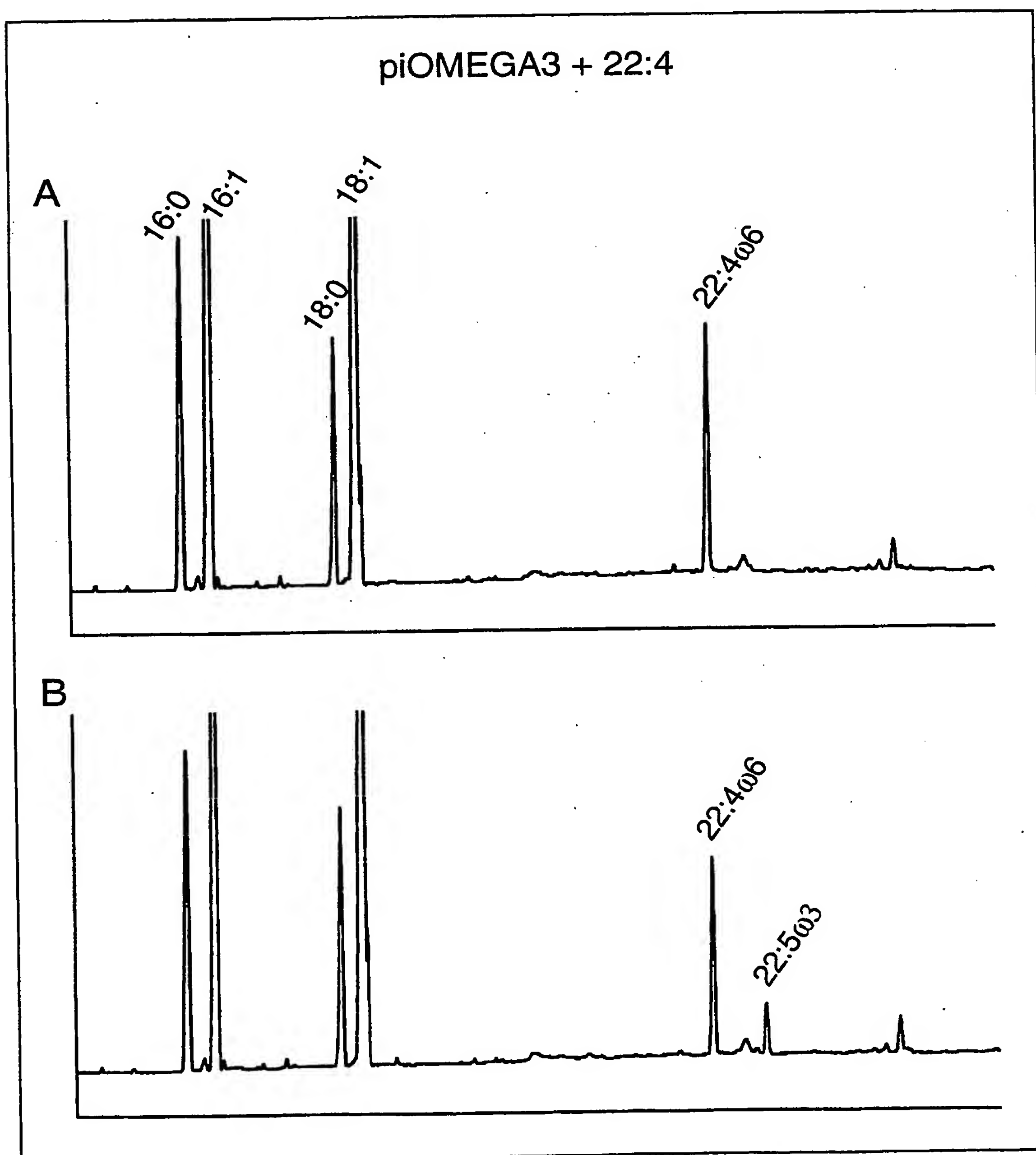
Figur 15: Desaturierung von C20:3- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:4- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des.



Figur 16: Desaturierung von Arachidonsäure (C20:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Eicosapentaensäure (C20:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des.



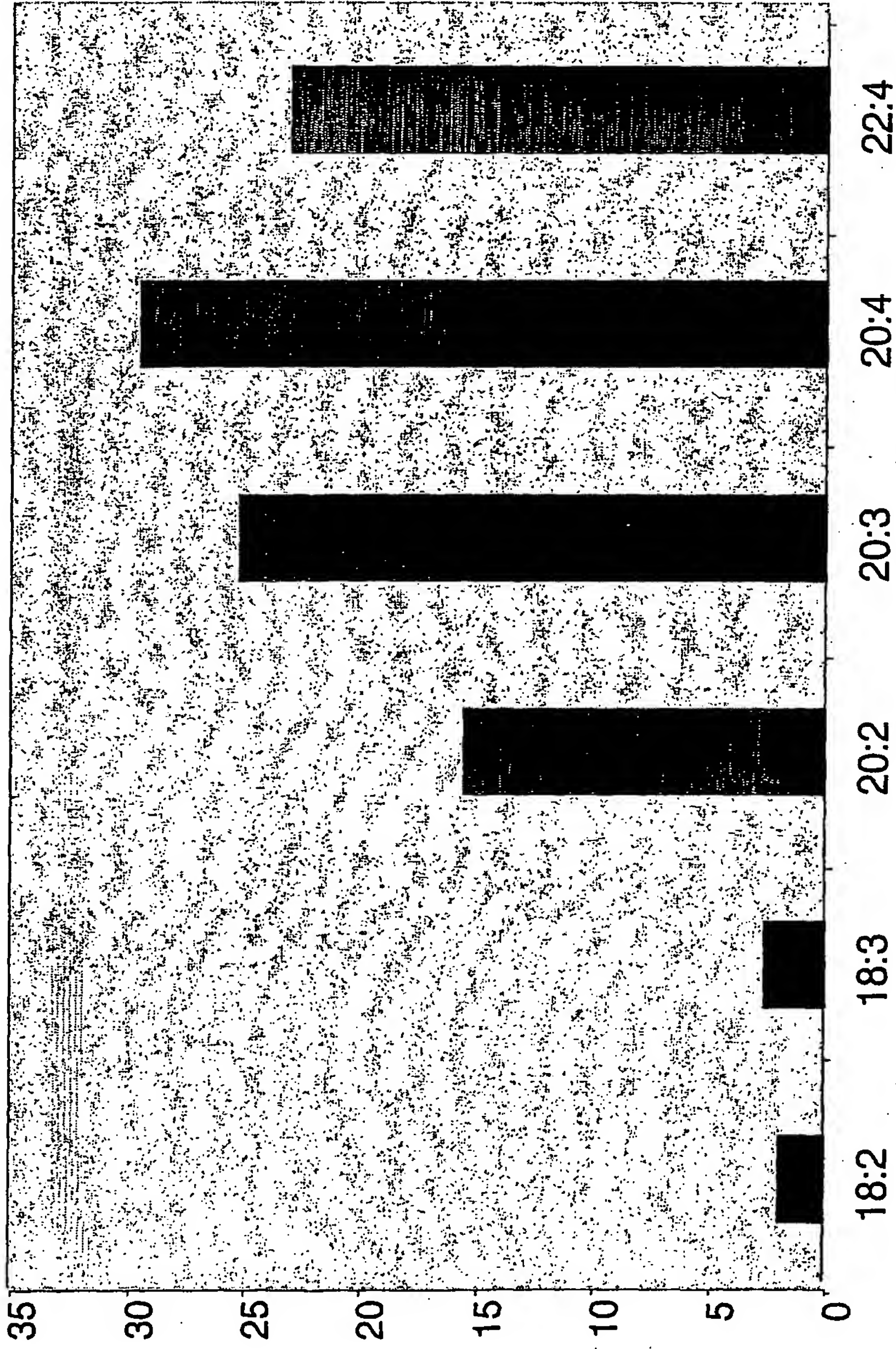
Figur 17: Desaturierung von Docosatetraensäure (C22:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Docosapentaensäure (C22:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.



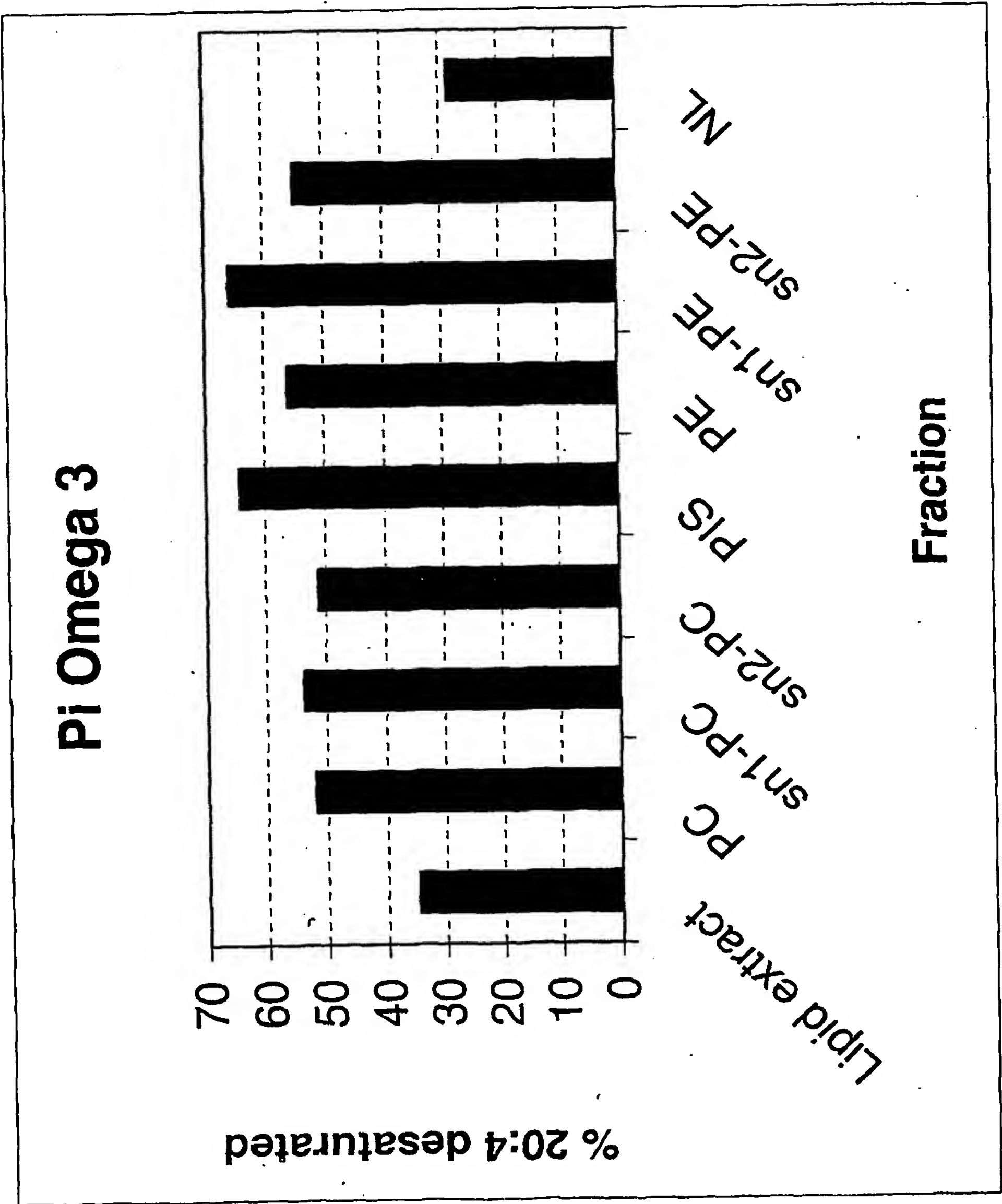


Figur 18: Substratspezifität der Pi-omega3Des gegenüber verschiedenen Fettsäuren

% Desaturierung

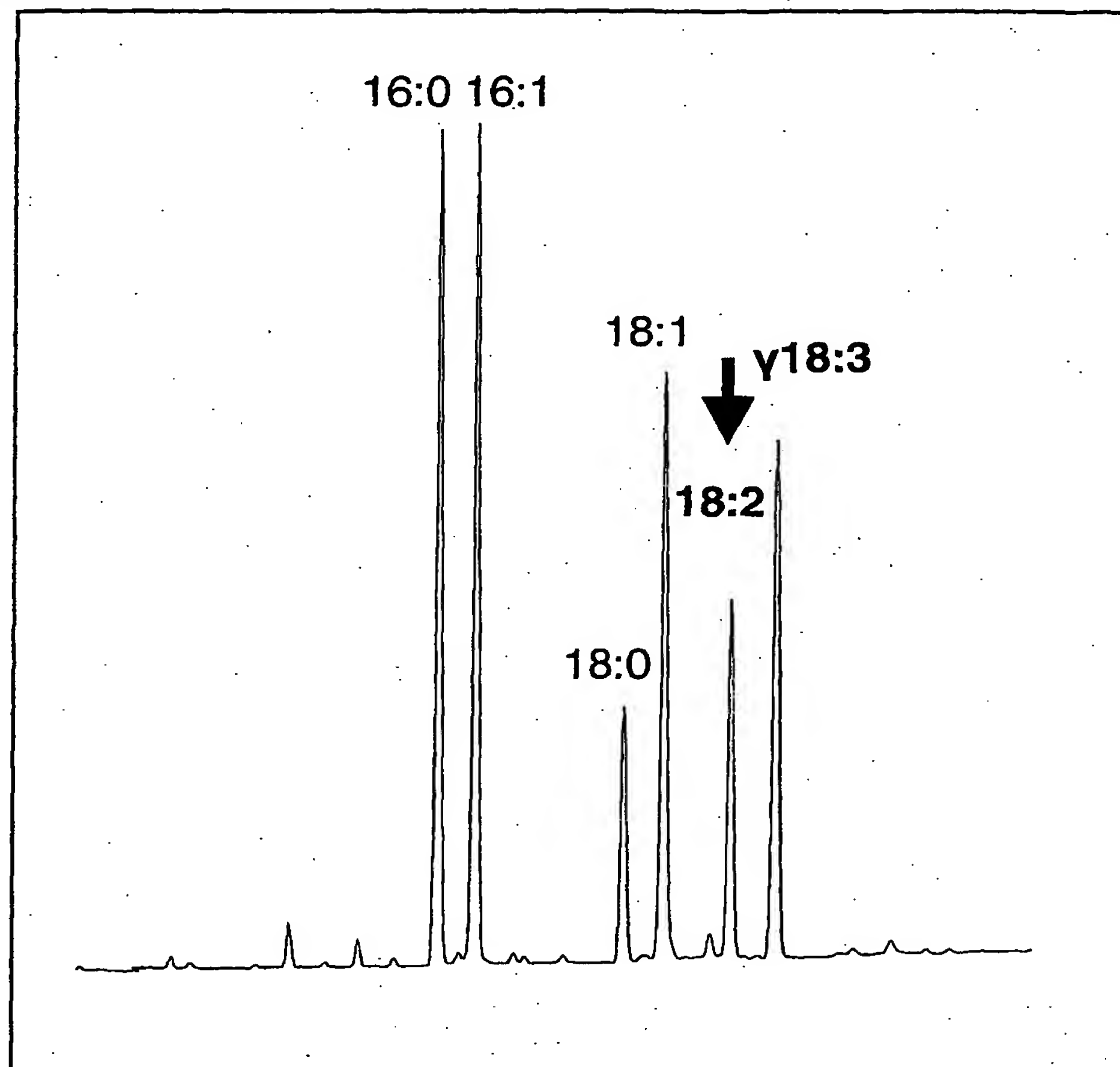


Figur 19: Desaturierung von Phospholipid gebundener Arachidonsäure zu EPA durch die Pi-Omega3Des



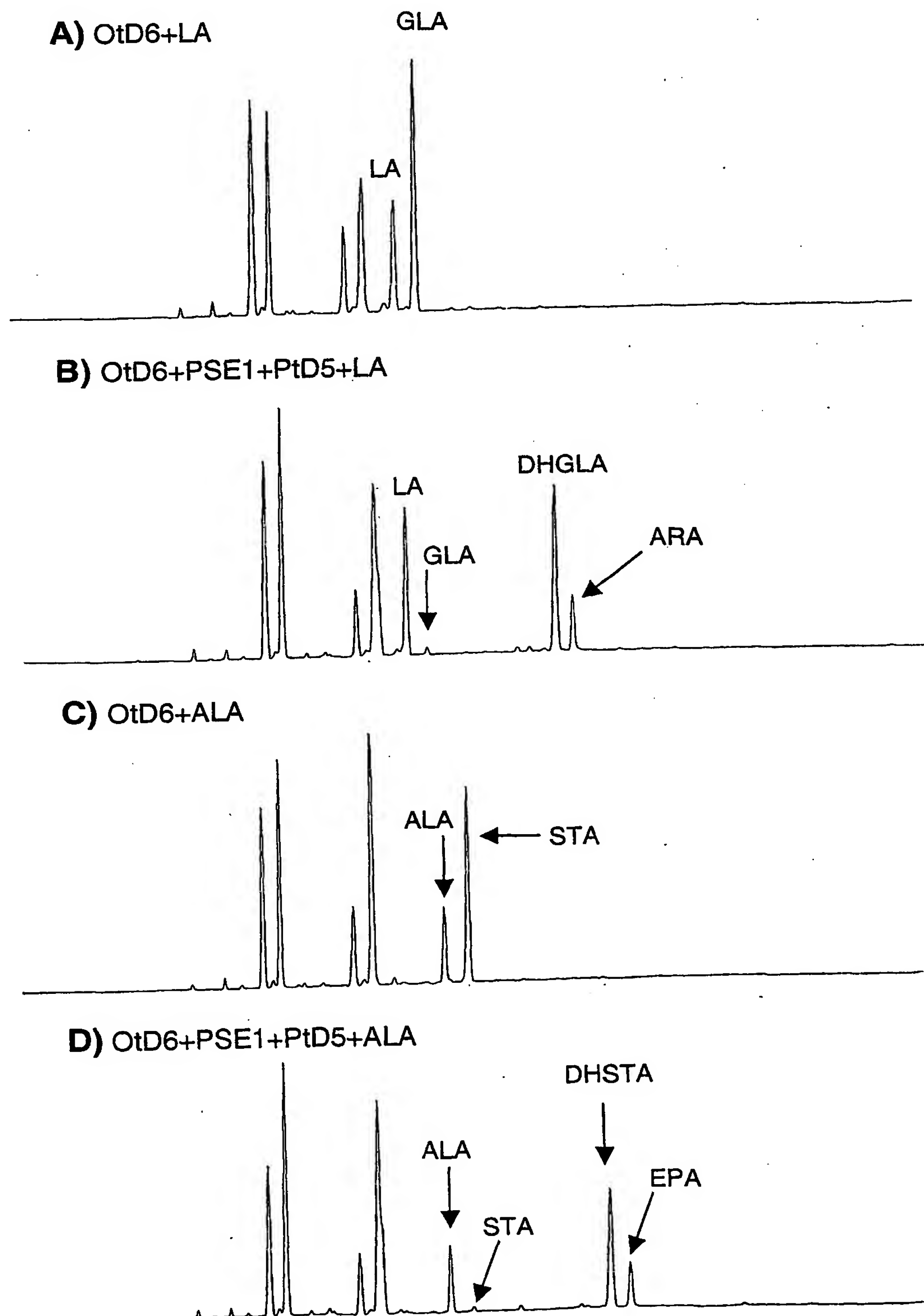
Figur 20: Umsetzung von Linolsäure (Pfeil) zu  $\gamma$ -Linolensäure ( $\gamma$ -18:3) durch Ot-Des6.1.

Absorption mAU



Retentionszeit

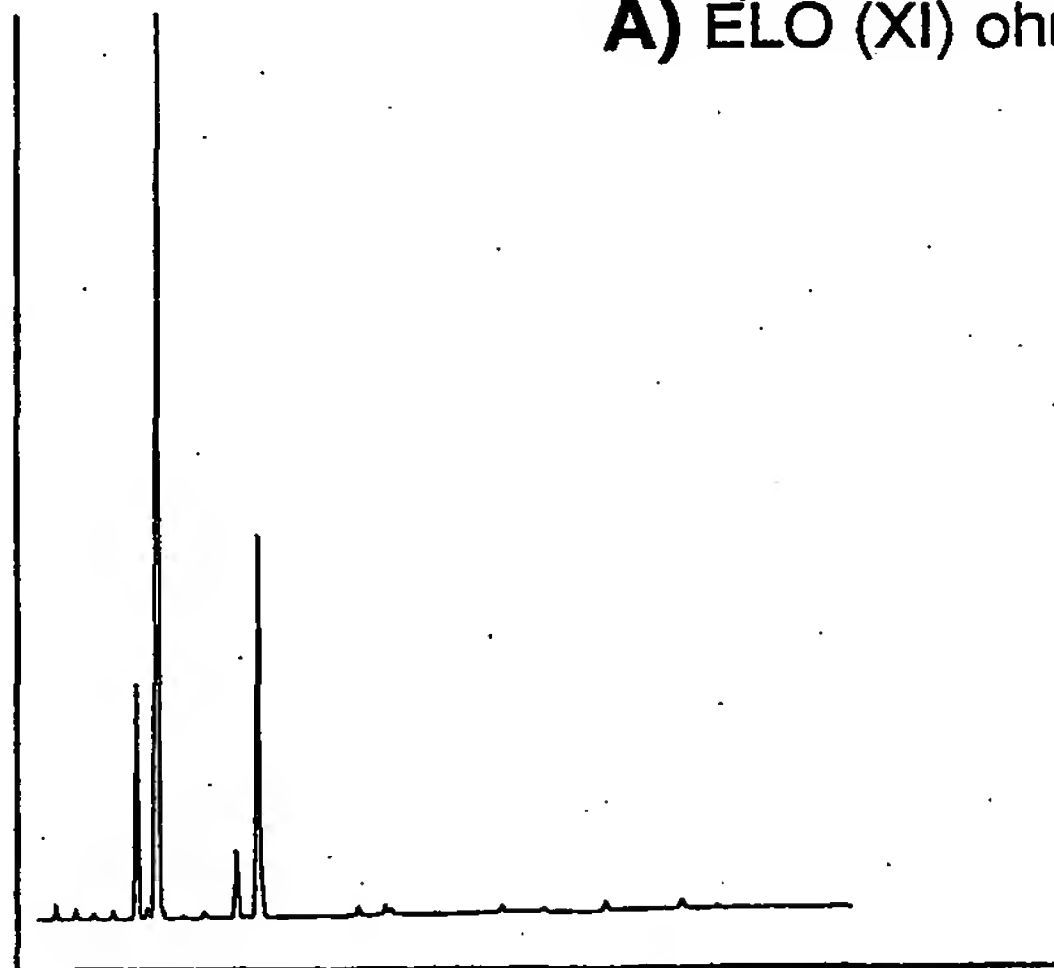
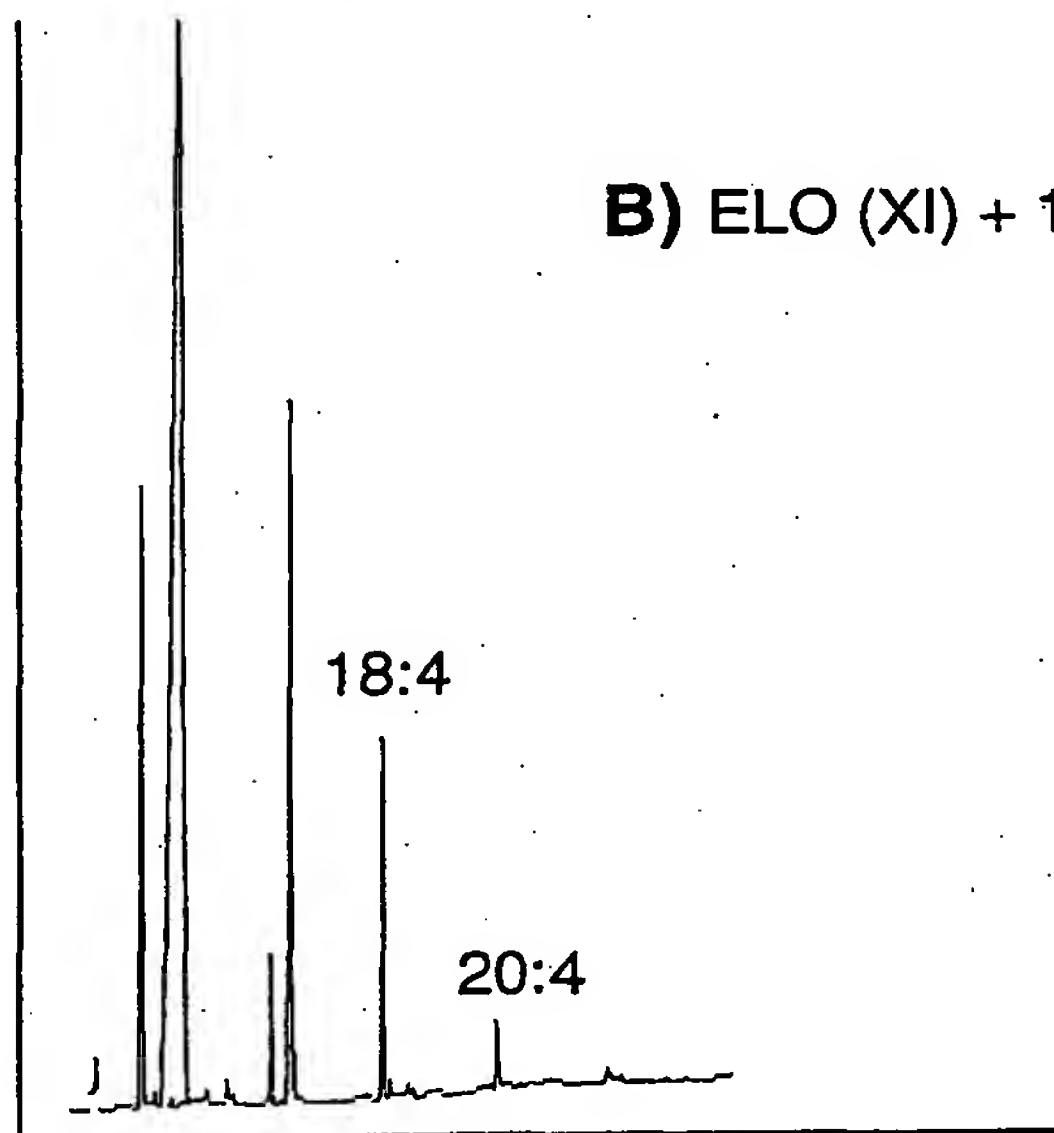
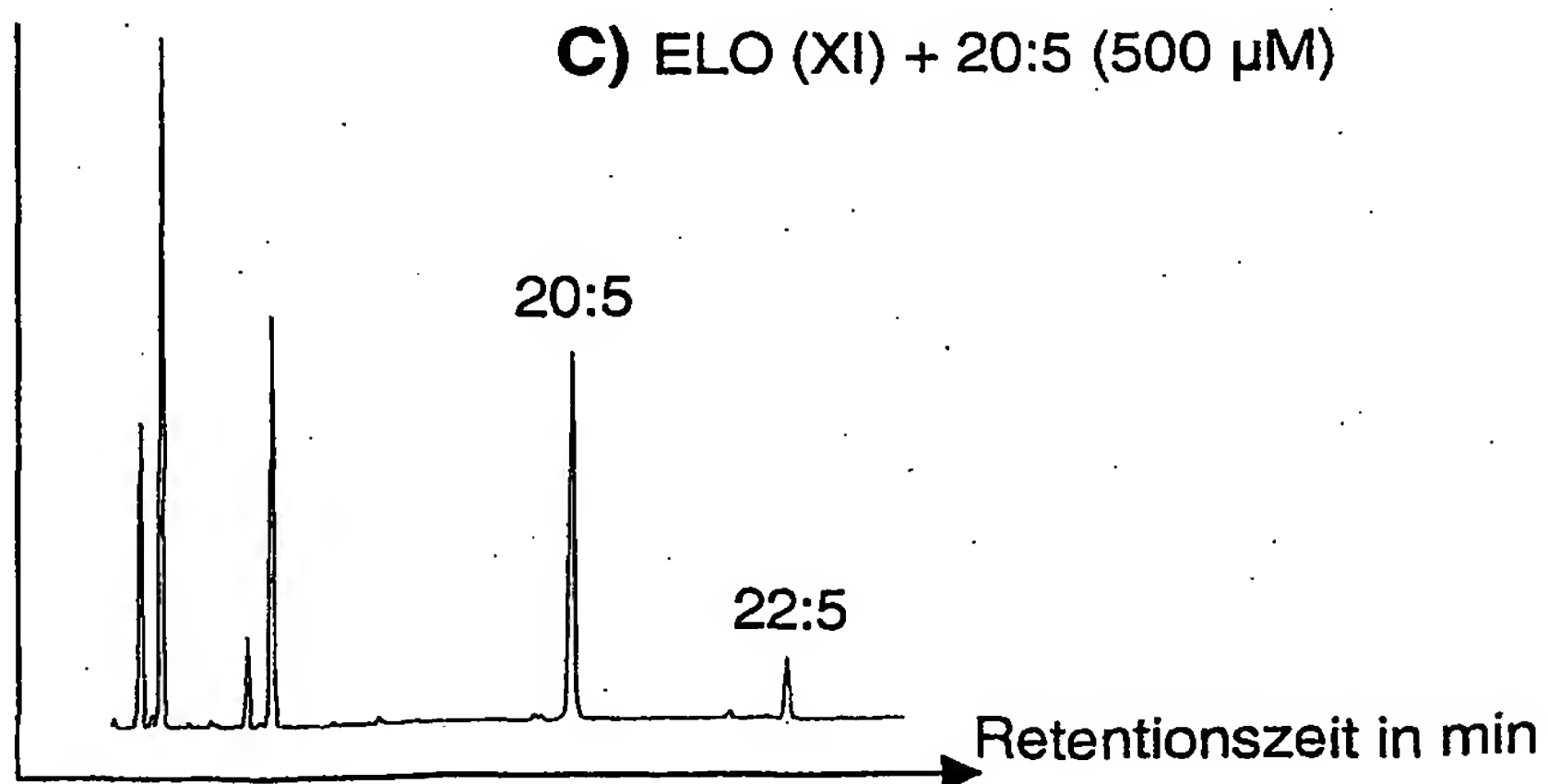
Figur 21: Umsetzung von Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure (A und C), sowie Rekonstitution des ARA- bzw. EPA-Syntheseweges in Hefe (B und D) in Gegenwart von OtD6.1.



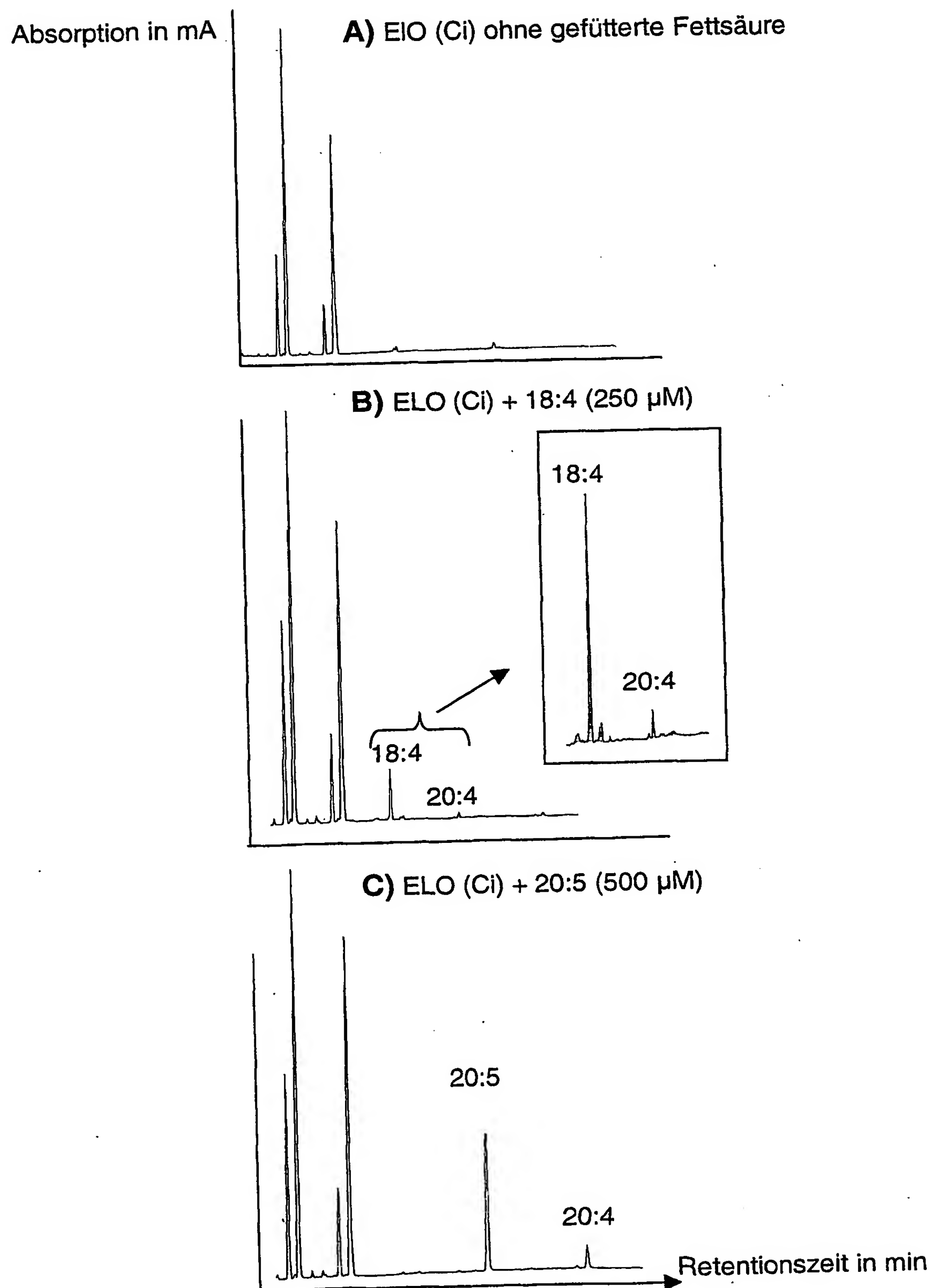


Figur 22: Expression von ELO(XI) in Hefe.

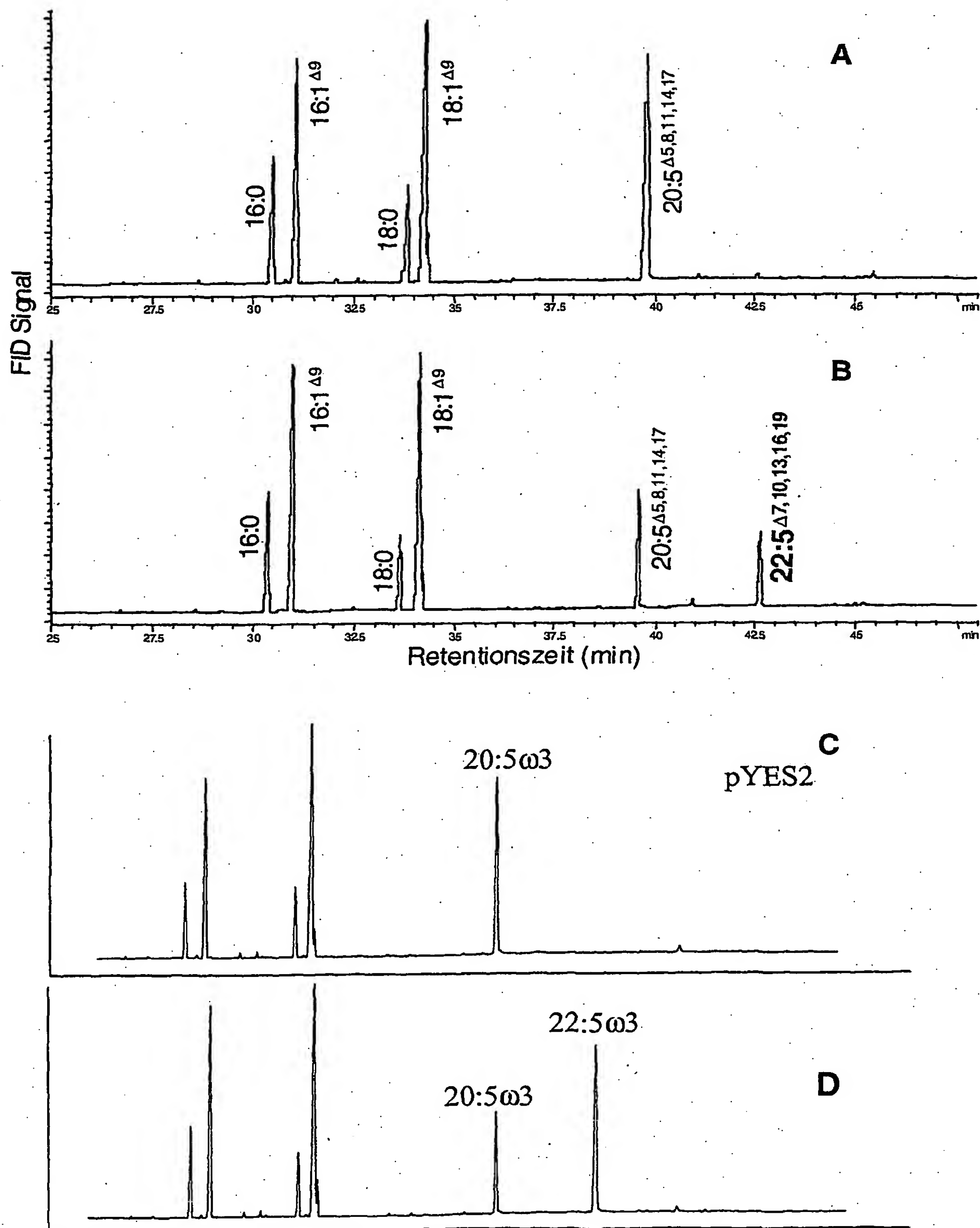
Absorption in mAU

**A)** ELO (XI) ohne gefütterte Fettsäure**B)** ELO (XI) + 18:4 $\Delta$ 6,9,12,15 (250  $\mu$ M)**C)** ELO (XI) + 20:5 (500  $\mu$ M)

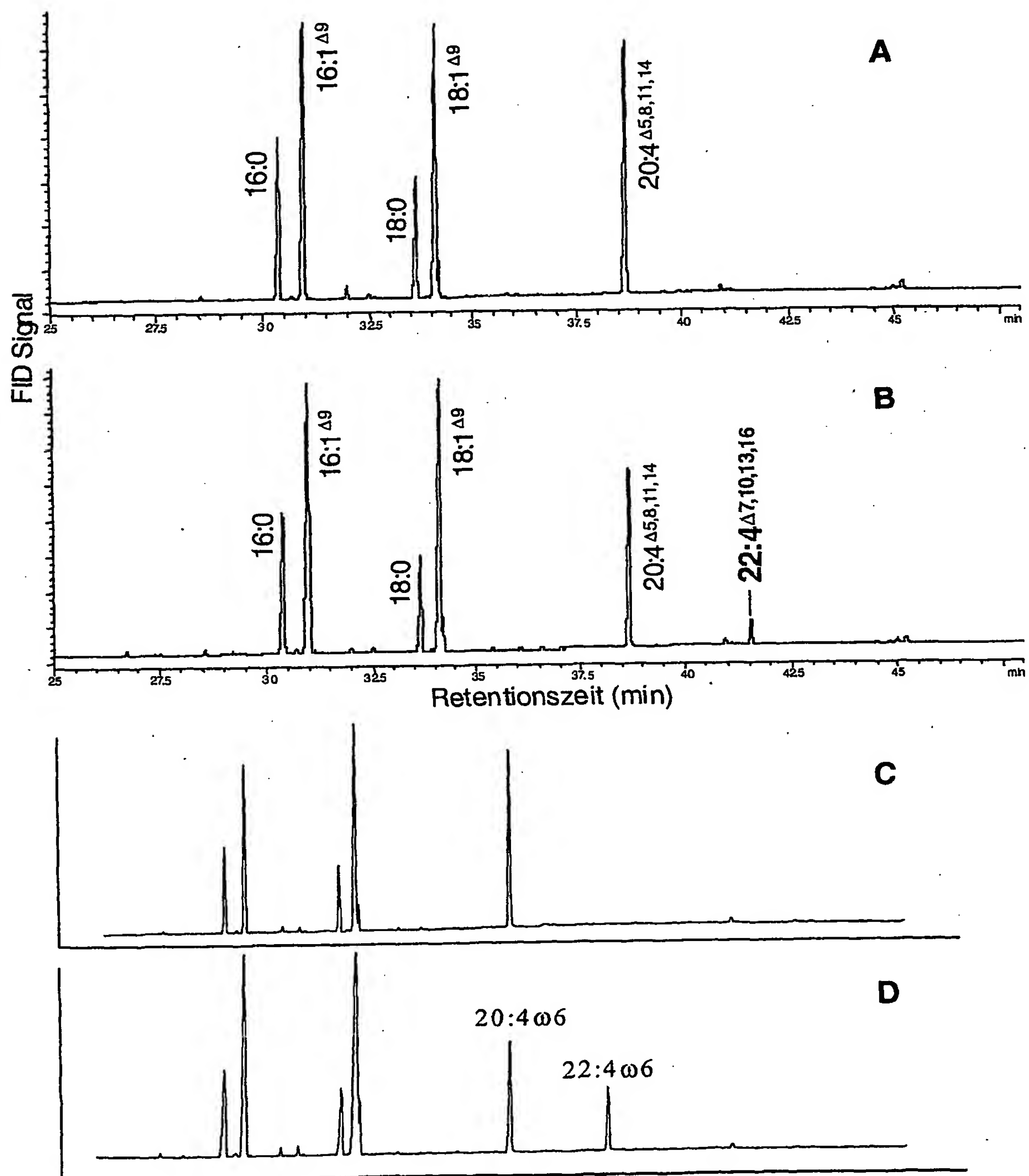
Figur 23:



Figur 24: Elongation von Eicosapentaensäure durch OtElo1 (B) bzw. OtElo1.2 (D). Die Kontrollen (A, C) zeigen nicht das Produkt der Elongation (22:5 $\omega$ 3).

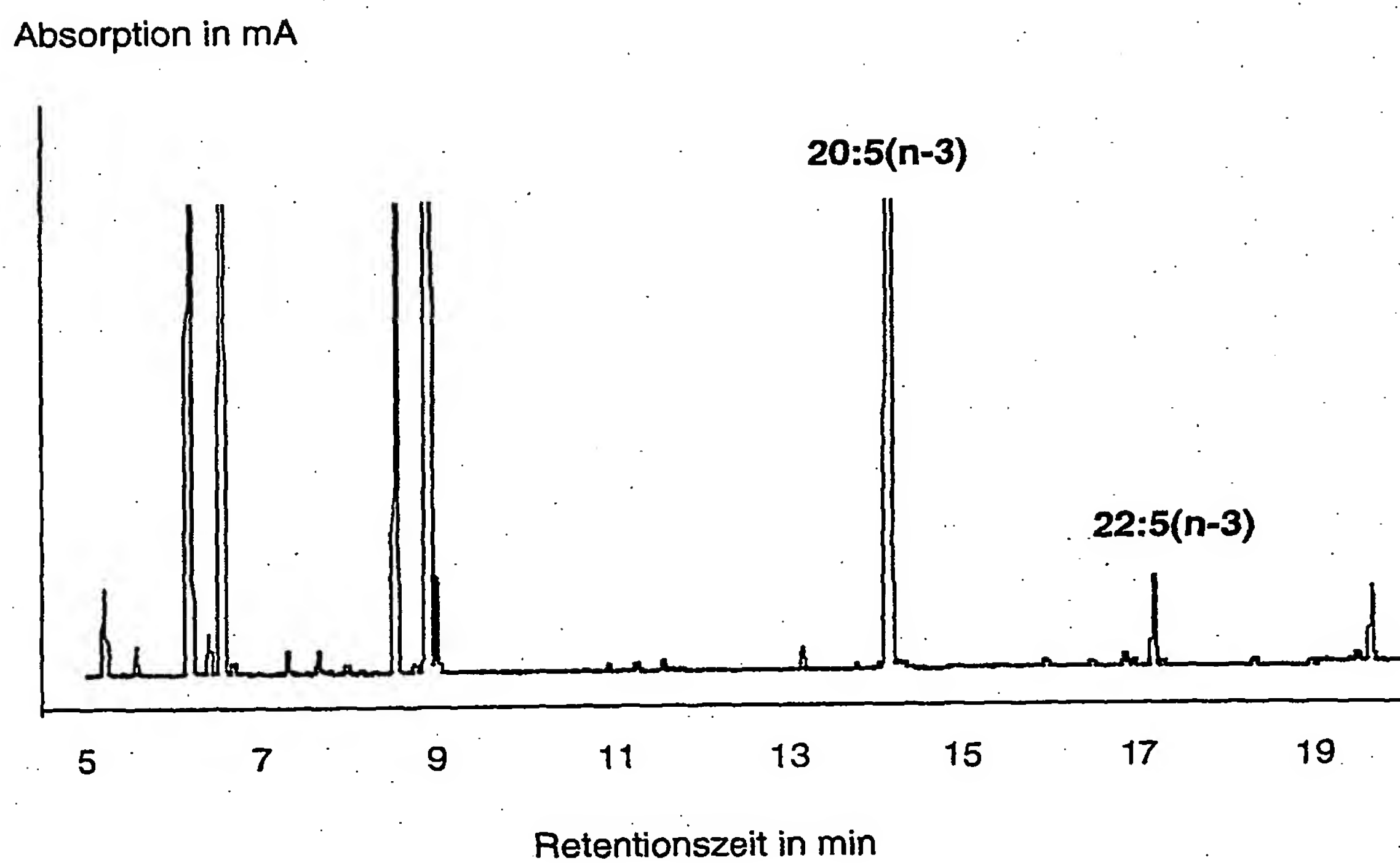


Figur 25: Elongation von Arachidonsäure durch OtElo1 (B) bzw. OtElo1.2 (D). Die Kontrollen (A, C) zeigen nicht das Produkt der Elongation (22:4 $\omega$ 6).

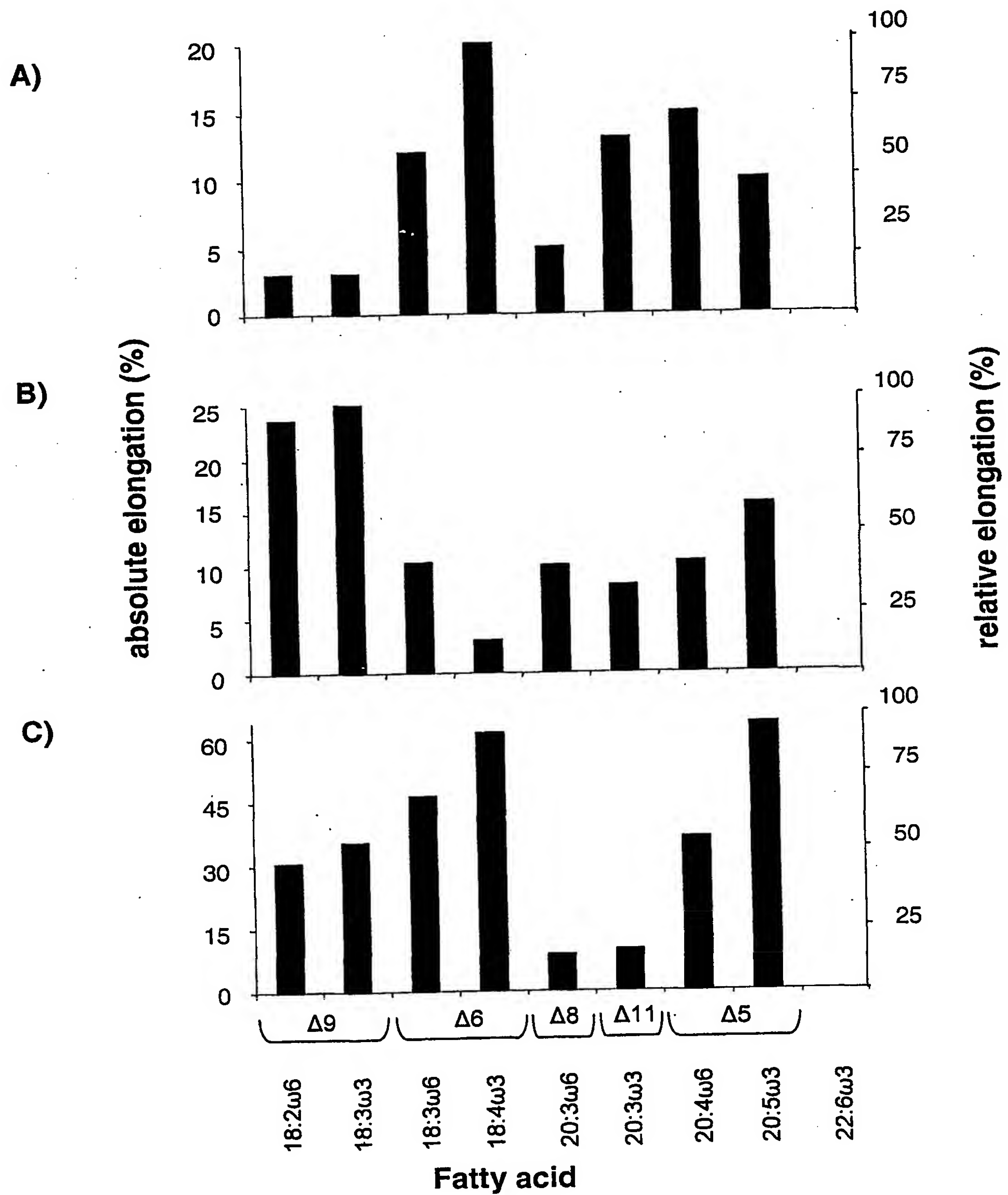




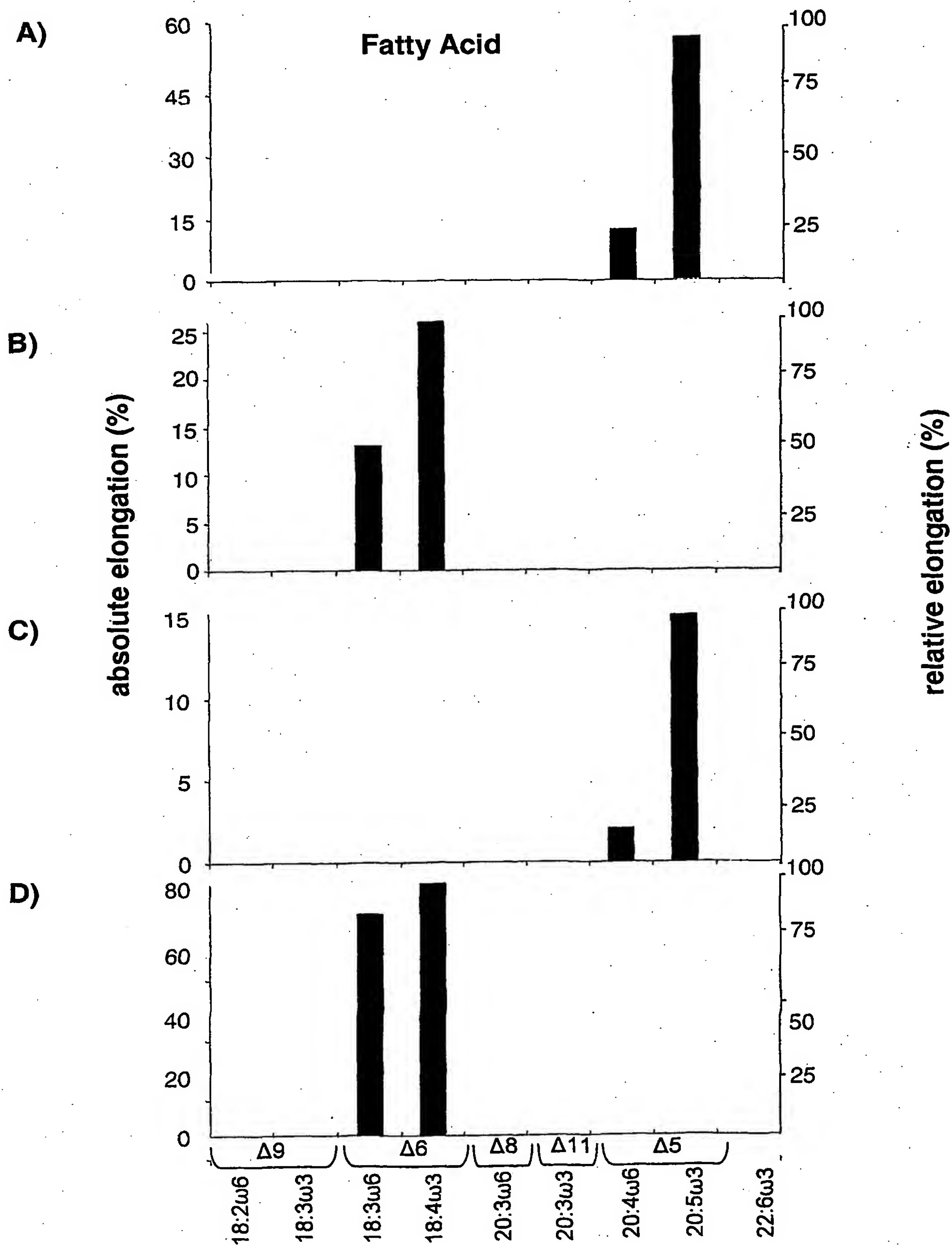
Figur 26: Elongation von 20:5n-3 durch die Elongasen At3g06470.



Figur 27: Substratspezifität der *Xenopus* Elongase (A), *Ciona* Elongase (B) und *Onchornynchus* Elongase (C)

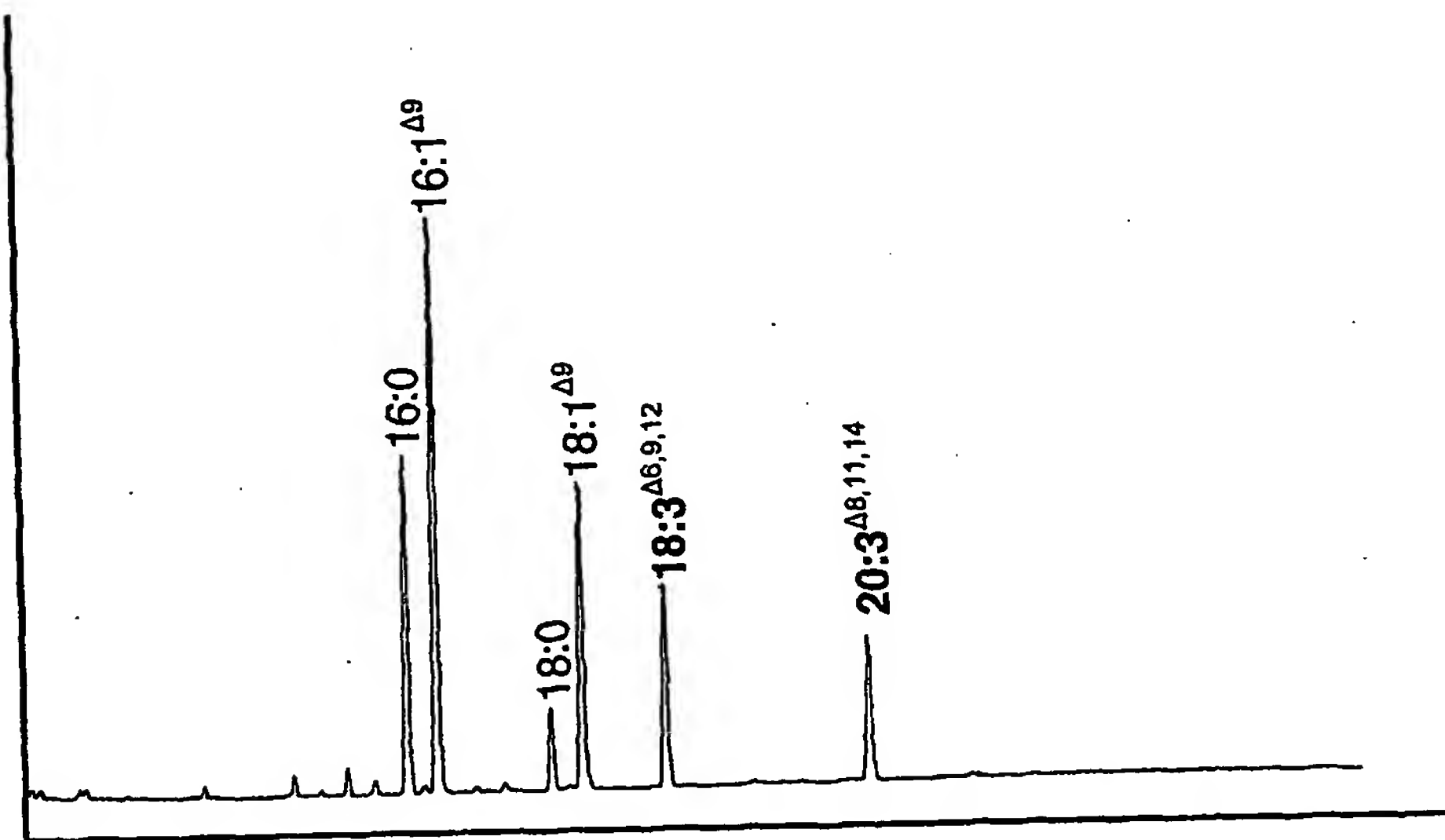


Figur 28: Substratspezifität der *Ostreococcus*  $\Delta$ -5-Elongase (A), der *Ostreococcus*  $\Delta$ -6-Elongase (B), der *Thalassiosira*  $\Delta$ -5-Elongase (C) und *Thalassiosira* *Ostreococcus*  $\Delta$ -6-Elongase (D)

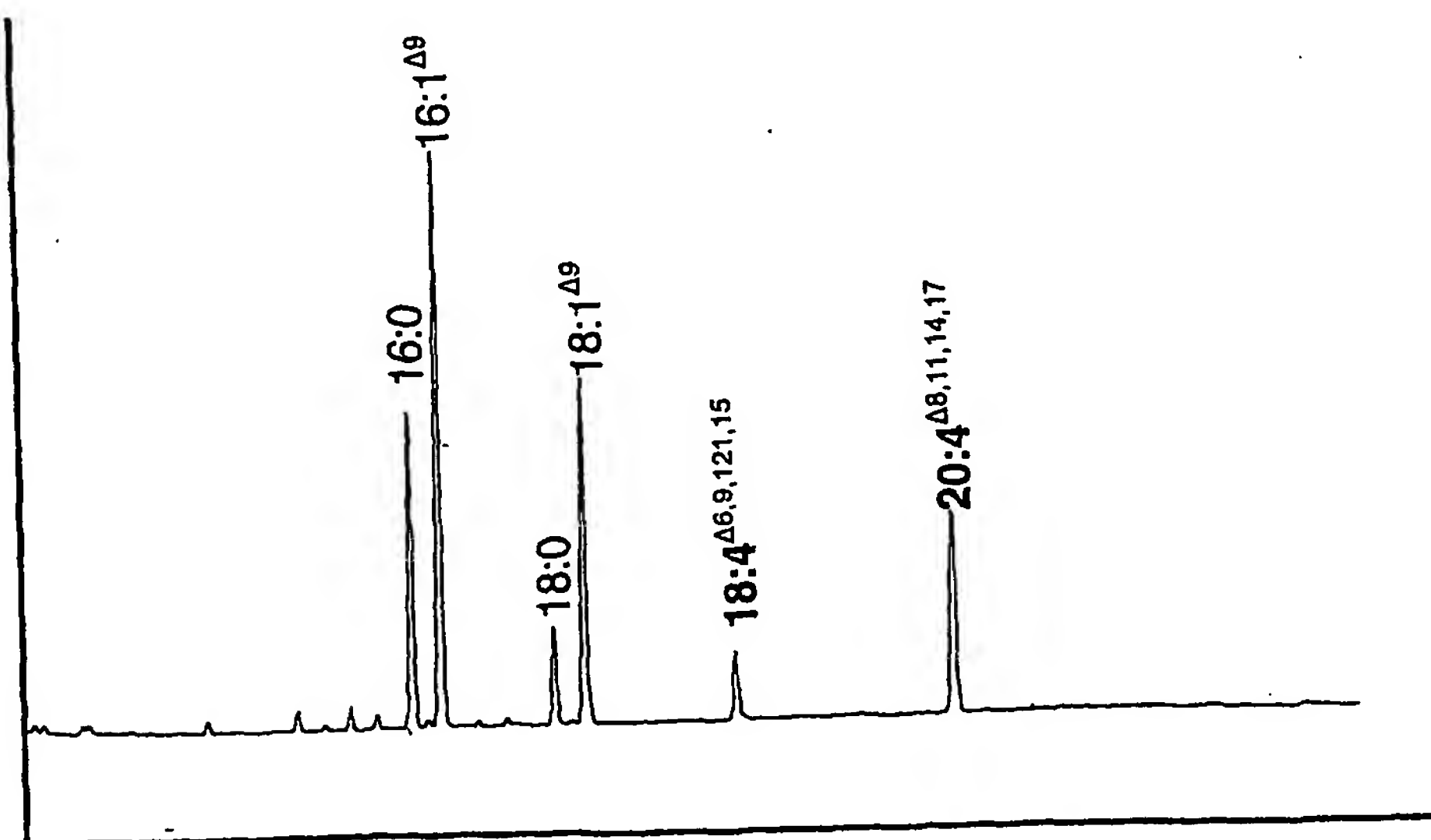


Figur 29: Expression der *Phaeodactylum tricornutum*  $\Delta$ -6-Elongase (PtELO6) in Hefe. A) zeigt die Elongation der C18:3 $^{\Delta 6,9,12}$  Fettsäure und B) die Elongation der C18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$  Fettsäure

A)



B)





30/30

Figur 30: Figur 30 zeigt die Substratspezifität von PtELO6 in Bezug auf die gefütterten Substrate.

